N° d'ordre 344
UNIVERSITE DE STRASBOURG FACULTE DES SCIENCES

THESES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Jean KREMBEL
licencié ès-sciences
Attaché de recherches au C.N.R.S.

PREMIERE THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LIPIDES BACTERIENS

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 21 février 1966 devant la Commission d'Examen :

MM. G. OURISSON — Président
A. DELUZARCHE
J.P. EBEL
E. LEDERER
R. MINCK — Examinateurs

— 1966 —

UNIVERSITE DE STRASBOURG FACULTE DES SCIENCES

THESES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Jean KREMBEL
licencié ès-sciences
Attaché de recherches au C.N.R.S.

PREMIERE THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LIPIDES BACTERIENS

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 21 février 1966 devant la Commission d'Examen :

MM. G. OURISSON — **Président**

A. DELUZARCHE
J.P. EBEL
E. LEDERER
R. MINCK — **Examinateurs**

— 1966 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Faculté des Sciences de l'Université de Strasbourg

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN.

Doyens Honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE.

Professeurs Honoraires : P. de BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, H. OLLIVIER, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférence Honoraire : R. WEIL.

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle PEREY M.	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle GAGNIEU A.	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie

G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
Cl. LEVY	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONCHAMP	T.T.P.	Physique
J. BOSCHER	P.S.C.	Mécanique des Fluides
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T:	Microbiologie
J. YOCCOZ	T.	Physique théorique
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
J. COGNE	T.T.P.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	P.S.C.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie biologique
J, PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme MAGNAC D.	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	P.S.C.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes Mathématiques de la Physique
G. LAPRAZ	P.S.C.	Botanique
M. ZISMAN	T.T.P.	Mathématiques
E. DANIEL	P.S.C.	Physique
P. CHEVALLIER	P.S.C.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mathématiques
P. CARTIER	T.	Mathématiques M.P.C.
G. REEB	T.	Topologie
F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme BRINI M.	P.S.C.	Chimie
G. PERNY	P.S.C.	Physique
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	P.S.C.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO	P.S.C.	Physique mathématique
P. GABRIEL	P.S.C.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères industriels

Professeurs Associés :

D. PATTERSON	Physicochimie macromoléculaire
S.R. DE GROOT	Physique nucléaire
F. SPITZER	Mathématiques

Maîtres de Conférences :

H. DANAN	Physique
A. CLAUSS	Chimie propédeutique
Mme WINTER Chr.	Physique
P.A. MEYER	Mathématiques
G. WEILL	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
R. OMNES	Physique théorique
Mme CAGNIANT D.	Chimie
E. FOLLENIUS	Zoologie
J. LUCAS	Géologie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
J. WEIL	Chimie biologique
M. DEMAZURE	Mathématiques
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
D. FOATA	Mathématiques
J.L. VERDIER	Mathématiques

Maîtres de Conférences associés :

V. AVANISSIAN	Mathématiques
E.B. CARTER	Physique nucléaire

Secrétaire : G. SAINT-PE

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous tenons à exprimer ici notre profonde gratitude à Monsieur R. MINCK, professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine, et à Monsieur A. DELUZARCHE, professeur de Chimie à la Faculté des Sciences de Strasbourg, qui ont inspiré et dirigé la première partie de ce travail et ont su nous communiquer leur enthousiasme pour la recherche.

Nous les remercions pour les encouragements qu'ils nous ont toujours prodigués et pour toute la sollicitude qu'ils nous ont témoignée.

Qu'il nous soit permis de remercier Monsieur le Professeur R. TULASNE, Directeur de l'Institut d'Hygiène, qui a bien voulu nous guider dans nos travaux. Nous lui sommes très reconnaissants pour son extrême bienveillance et son soutien constant.

La deuxième partie de ce travail a été effectuée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, sous la direction de Monsieur le professeur E. LEDERER, qui nous a accueillis plusieurs fois dans son Institut pour nous permettre de nous familiariser avec la chimie des stéroïdes et des acides mycoliques. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Nous remercions Monsieur le professeur G. OURISSON, qui a bien voulu accepter de présider notre Jury de thèse, pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Monsieur le professeur J. P. EBEL a bien voulu faire partie de notre Jury de thèse ; nous lui en sommes très reconnaissants. Nous le remercions également pour l'accueil aimable qu'il nous a toujours réservé.

Nous tenons également à remercier Monsieur A. BUSSARD, Directeur de recherches au C.N.R.S., qui nous a parrainés au C.N.R.S., pour sa constante sollicitude à notre égard ainsi que Madame le professeur M. BRINI, qui n'a cessé de nous prodiguer ses conseils.

Nous remercions tous nos amis de l'Institut d'Hygiène et de Bactériologie et de l'Institut de Chimie qui ont participé aux différentes étapes de ce travail, en particulier Madame SCHON et Madame NORTH, dont la collaboration technique nous a grandement facilité la tâche et dont le dévouement est digne d'éloge.

Nos remerciements vont également à Monsieur M. BARBIER et à Monsieur A. H. ETEMADI, qui nous ont accueillis dans leurs groupes à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles et nous ont fait profiter de leurs expériences.

Les spectres de masse ont été effectués à GIF-SUR-YVETTE par Madame ORLEY, puis par Monsieur P. VARENNES, que nous remercions particulièrement pour la qualité exceptionnelle des spectres et la diligence apportée à leur exécution.

Les spectres de RMN ont été effectués par Madame ALLAIS à GIF-SUR-YVETTE et par Monsieur F. HEMERT à Strasbourg ; qu'ils en soient remerciés.

Introduction

L'étude systématique des constituants chimiques des bactéries ne s'est développée que depuis quelques années. Cette évolution est due en grande partie à la mise au point de techniques nouvelles, plus précises et plus sensibles, exigeant des quantités moins importantes de matière première.

Dès 1889 HAMMERSCHLAG(1) attire l'attention des chercheurs sur la grande richesse en lipides de *Mycobacterium tuberculosis*. En dépit de nombreux travaux, peu de choses étaient connues sur la composition des lipides bactériens jusqu'en 1927, où ANDERSON et son école (2 à 11) en entreprennent l'étude systématique. Leurs travaux furent ensuite élargis et approfondis, grâce à l'utilisation de techniques modernes, par ASSELINEAU et LEDERER en particulier (12 à 24).

Nous leurs devons l'essentiel de nos connaissances sur les lipides des Mycobactéries.

Les travaux actuels tendent à préciser la nature et le rôle de ces corps dans l'organisation de la cellule bactérienne (25 à 29). Si les bactéries semblent incapables de synthétiser le cholestérol et les sphingomyélines, elles élaborent, par contre, des lipides de structures variées: acides gras, normaux, saturés et insaturés, ramifiés, glycérides, phospholipides, glycolipides, peptidolipides, peptidoglycolipides, lipopolysaccharides.

La présence de ces lipides dans la cellule bactérienne a des effets biologiques variés. NOLL, ASSELINEAU, BLOCH et LEDERER(30) ont identifié le «Cord factor», qui serait responsable de la virulence des Mycobactéries, comme étant le 6,6'dimycolate de tréhalose. Les propriétés biologiques du lipide A, obtenu par hydrolyse de l'antigène O (complexe peptidoglycolipidique (31), sont discutées (32, 33). Les cires D des Mycobactéries sont des adjuvants d'immunité (34). Les lipides sont également liés aux problèmes de structure et de formation de la paroi bactérienne (35 à 38).

Dans la première partie de ce travail, nous comparons qualitativement et quantitativement les lipides des formes L d'une Entérobactérie *(Proteus P_{18})* à ceux des formes bactériennes d'origine. Les formes L (39, 40) sont des variants bactériens, obtenus in vitro dans des conditions de culture particulières, qui sont caractérisés par l'absence de paroi rigide. VENDRELY et TULASNE (41, 42), les premiers, ont signalé l'augmentation de la teneur en lipides des formes L de *Proteus* P_{18}. Ces travaux ont ensuite été confirmés et développés par MANDEL et coll. (43 à 47), mais aucune étude de la composition chimique complète de ces lipides, qui semblaient, d'après des études préliminaires, (48, 49) être responsables de réactions tissulaires analogues à ceux de certaines Mycobactéries, n'a été entreprise.

Cette première partie comporte les chapitres suivants :

I. Extraction et fractionnement des lipides;
II. Les acides gras libres ;
III. Les graisses neutres ;
IV. Les phospholipides et les cires A ;
V. Les cires chloroformiques et les lipides liés.

Dans la deuxième partie, nous étudions un nouveau type d'acides mycoliques isolé de *Mycobacterium smegmatis*. Leur structure et leur biogénèse y sont décrites et la signification de leur présence chez une Mycobactérie y est discutée.

Cette deuxième partie se divise en deux chapitres :

I. Structure des acides α'smegmamycoliques ;
II. Biogénèse de ces mêmes acides à partir de palmitate de potassium marqué.

Dans chaque chapitre, nous exposons nos résultats, puis, dans une seconde partie, nous décrivons les expériences qui ont permis d'aboutir à ces résultats.

Etude bibliographique

Dans cette étude, nous résumons brièvement les méthodes utilisées et les résultats obtenus dans la chimie de certaines bactéries parmi les plus étudiées : Mycobactéries, Corynébactéries, Nocardia, PPLO et *Escherichia Coli, etc...*

A. - *Méthodes utilisées*

Elles sont classiques : après extraction et purification des lipides, le fractionnement les sépare en différents groupes : glycérides, phospholipides, cires . . . ensuite, après hydrolyse, les constituants sont identifiés.

Les méthodes de fractionnement : nous citerons pour mémoire les plus courantes. La séparation en différentes catégories se fait par solubilité sélective dans des solvants variés (7, 12, 22), par chromatographie sur colonne (50 à 53), sur plaque (54), en phase gazeuse (55 à 58), par inclusion dans l'urée (59, 60).

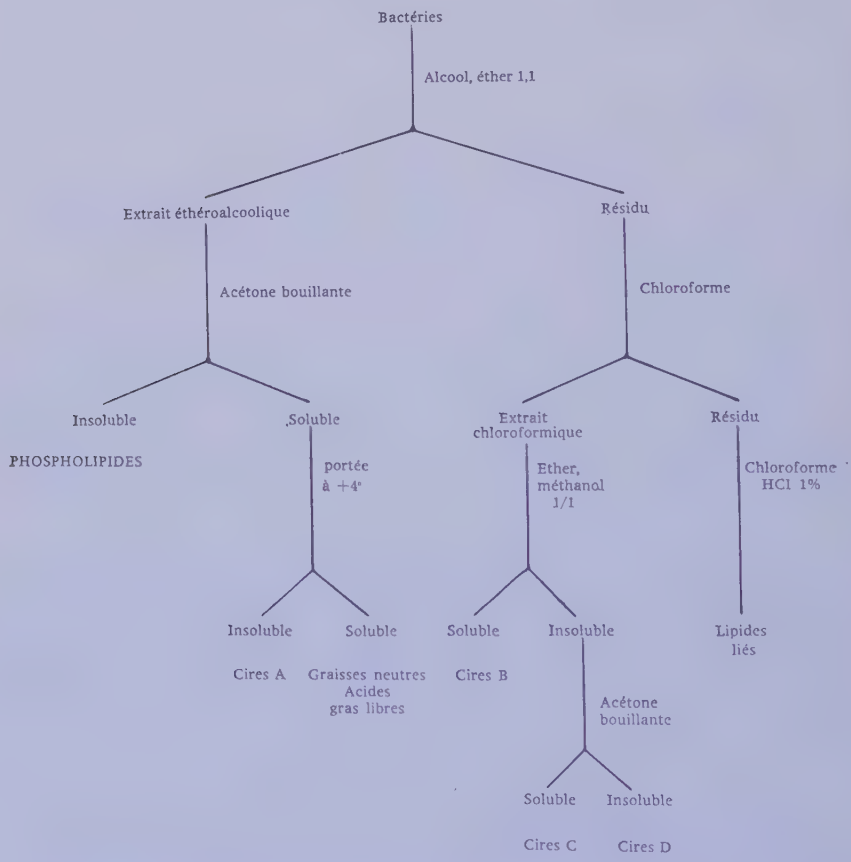
Les méthodes d'identification concernent surtout les produits d'hydrolyse, en particulier les acides gras : hydrogénation quantitative, indices de saponification, d'acide, d'acétyle, point de fusion, pouvoir rotatoire, dispersion rotatoire, dosage des groupes méthyles (61), oxydation (62), décarboxylation sulfo-chromique (63, 64).

Les méthodes physicochimiques sont les plus employées car elles ne nécessitent que peu de produits ; elles ont été appliquées à l'étude des lipides complexes : la spectrographie U.V. (65, 66), la spectroscopie I.R. (67), l'étude aux Rayons X (68 à 70), la spectrométrie de masse (71 à 83), de R.M.N. (84, 85), les propriétés des couches monomoléculaires (86).

B. - *Etude des lipides rencontrés chez des espèces bactériennes.*

L'étude des lipides des Mycobactéries a été réalisée principalement par deux écoles : celle d'ANDERSON (2 à 11, 87 à 90), et ensuite celle d'ASSELINEAU et de LEDERER (12 à 24, 77 à 83 . . .).

L'extraction et le fractionnement des lipides ont été réalisés selon le schéma suivant :



L'étude des fractions ainsi obtenues a montré que :

1°) *la fraction soluble dans l'acétone contient :*

a) les graisses neutres qui se composent de mélanges complexes de glycérides (50, 91) ou d'esters de sucres (5,92).

TABLEAU I

Principaux acides entrant dans la constitution des lipides

Acides saturés normaux	C_{12} à C_{26} (56 à 59, 93)
Acides insaturés normaux	C_{16} à C_{18} (94)
Acides ramifiés saturés	Acides iso et antéiso en C_{15}, C_{17} (95) Acide tuberculostéarique $C_{19}H_{28}O_2$ (96) (Acide méthyl-10-octadécanoïque) Acide mycocérosique $C_{32}H_{64}O_2$ (97, 98) ou mycocéranique
Acides ramifiés insaturés	Acides «phtioïques» (87, 88) } mycolipénique $C_{27}H_{52}O_2$ (99) phtiénoïques ramifiés, insaturés en C_{27}, en C_{29} (68) Acide diphtérique, Acide corinnique } $C_{35}H_{68}O_2$ (90, 100)
Acides à noyau cyclopropanique	Acide lactobacillique $C_{19}H_{36}O_2$ (101 à 106) et acide phytomonique Acide $C_{17}H_{32}O_2$ (56 à 60)
Acides hydroxylés	Acide corynomycolique $C_{32}H_{64}O_3$ (107, 108) C_{34} ; C_{36} (109) Acide corynomycolénique $C_{32}H_{62}O_3$ (110) C_{34} ; C_{36} (109) Acide hydroxycorinnique (100, 101) Acides nocardiques C_{48} à C_{56} (79) Acide corynolique (90, 112) Acides mycoliques $C_{88}H_{176}O_3$ (113 à 120) $C_{87}H_{174}O_3$ (121) $C_{79}H_{154}O_3$ (76) $C_{80}H_{156}O_3$ (78)
Acides aromatiques	Acide phénylacétique (113) Acide salicylique (113) Acide anisique (5)

b) les acides gras libres. Les mêmes acides gras sont trouvés en général dans les produits d'hydrolyse de toutes les fractions (glycérides, phospholipides . . .). Le tableau I donne un aperçu des principaux acides rencontrés dans les lipides des Mycobactéries, Corynébactéries, Nocardia Asteroïdes et dans ceux *d'Escherichia Coli, etc...*

2°) *la fraction insoluble dans l'acétone bouillante contient les phospholipides.*

Ils comprennent :

a) les acides phosphatidiques (25, 122 à 127) et leurs sels de sodium, de calcium ou de magnésium.

b) les lécithines ou phosphatidylcholines (128) n'ont été mises en évidence que dans quelques cas rares, jamais chez les Mycobactéries.

c) les céphalines ou phosphatidyléthanolamines (129, 130) fréquemment rencontrées dans les lipides bactériens, sauf chez les Mycobactéries.

d) les phosphoinositides étudiés par ANDERSON (4, 5, 11, 131 à 133), puis par VILKAS et LEDERER (24, 52). La structure d'un myo-inositol-phospholipide a été déterminée par BALLOU, VILKAS et LEDERER (134), puis par BALLOU et LEE (135).

e) le lipide A : ce lipide, obtenu après hydrolyse de l'antigène 0 des bactéries à Gram négatif, contient du phosphore et de l'azote mais n'est peut-être pas un phospholipide au sens vrai du terme (136 à 138).

f) les phospholipides azotés où les acides aminés semblent être liés à l'éthanolamine et à la sérine (139 à 141). Selon certaines études récentes, ce seraient des protéolipides entraînés par des phospholipides (142).

3°) *La fraction insoluble dans l'acétone à froid contient les cires A.*

Cette fraction est dénommée «cires» en raison de sa consistance, mais non d'après sa composition chimique (2, 12).

Ce sont des mélanges de glycérides, d'esters de phtiocérol (22, 143 à 145) et d'acides gras libres (acides mycoliques).

Dans le cas du bacille de la «lèpre», ANDERSON (18) a obtenu la «léprosine» substance qui, par saponification, donne du (+) eicosanol-2, du D-octadécanol-2 et l'acide léprosinique (acides mycoliques?).

4°) *La fraction extraite par le chloroforme contient les cires.*

Des cires vraies, esters d'acides gras à longues chaînes et d'alcools, n'ont été isolées que dans le cas des Mycobactéries et des Corynebactéries.

Ces lipides extraits par le chloroforme ont été fractionnés par différence de solubilité dans l'acétone et le méthanol en :

a) cires B (3), solubles dans le mélange éther-méthanol 1/1.

b) cires C (30), solubles dans l'acétone bouillante, de composition voisine des Cires A. ASSELINEAU et LEDERER en ont isolé le 6,6' dimycolate de tréhalose qui correspond au «Cord factor».

c) cires D, insolubles dans l'acétone bouillante, souvent souillées de phospholipides. Elles sont en général composées d'acides mycoliques, d'une fraction polysaccharidique (3,23) et d'une fraction peptidique (19, 22, 146 à 148).

Dans le cas des Mycobactéries, ces cires D ont des propriétés antigéniques identiques à celles du lipopolysaccharide «P.m.k.o.» de CHOUCROUN (13, 149). Elles ont également des propriétés d'adjuvant d'immunité (19, 34, 150).

5°) *Les lipides liés.*

Ils proviennent sans doute de l'hydrolyse d'un complexe lipidique (151) et sont de compositions analogues aux cires D.

Des protéolipides ont été isolés dans le cas des formes L de *Proteus* P_{18} (152).

Techniques générales utilisées

A - *CHROMATOGRAPHIE*

Au cours de notre travail, nous avons eu recours à la chromatographie comme méthode analytique et comme méthode préparative.

Pour l'identification des lipides ou des produits d'hydrolyse, nous avons effectué soit des chromatographies sur papier, soit des chromatographies sur couche mince. Les systèmes de solvants dépendent des produits à séparer, nous les décrivons chaque fois que nous utilisons cette technique pour l'analyse et la recherche des substances.

1°) *Chromatographie sur colonne.*

Les absorbants dont nous avons fait usage sont l'acide silicique Mallinckrodt, l'alumine, le gel de silice G Merck, la poudre de cellulose Whatman.

Les échangeurs d'ions utilisés sont la Permutite 50, le Dowex 50, sous forme de sel d'ammonium, et l'Amberlite MB_3.

2°) *Chromatographie sur papier.*

Sur papier Whatman 1 et 4, Schleicher et Schüll silicé. Nous avons utilisé la méthode ascendante et descendante.

3°) *Chromatographie sur plaque.*

Les *plaques de cellulose* sont préparées avec de la cellulose Pleuger.

Pour les plaques de silice, nous avons utilisé de l'acide silicique Mallinckrodt mélangé avec 10% de plâtre selon BARBIER, TOBIAS, JAEGER (153) ou du gel de silice G ou du Kieselguhr Merck pour chromatographie sur couche mince. Les plaques ont été préparées manuellement ou avec

l'appareil Desaga et activées 1/2 heure à 3 heures selon les substances à séparer.

Les chromatographies sur gel de silice imprégné par $AgNO_3$ ont été réalisées, selon MORRIS, (154) de la manière suivante :

Pour une plaque de 10×20 cm, nous utilisons 10 g de gel de silice contenant 5% de $AgNO_3$. Ces plaques sont abandonnées 1/2 heure à la température ambiante à l'obscurité, puis, juste avant l'utilisation, activées pendant 20 minutes à 110°.

Pour les chromatographies préparatives sur plaque de 25×35 cm, nous utilisons 50 g de gel de silice à 5 % de $AgNO_3$.

Révélateurs :

Comme révélateurs, nous avons utilisé les réactifs suivants :

— réactif de PARTRIDGE (155) (pour les sucres réducteurs), composé de :
  — 0,93 g d'aniline
  — 1,66 g d'acide phtalique
  — 90 ml de butanol
  — 10 ml d'eau

— réactif de HANES et ISHERWOOD (156), modifié par BURROWS et coll. (157) (pour les composés phosphorylés). Sa composition est la suivante :
  — 1 g de molybdate d'ammonium dans 8 ml d'eau
  — 3 ml HCl concentré
  — 3 ml $HClO_4$ à 70 %

on complète à 100 ml avec de l'acétone.

Le chromatogramme ou la plaque sont séchés pendant quelques minutes à 85° et soumis aux rayons U.V., selon BANDURSKI et AXELROD (158), ce qui accélère l'apparition des taches bleues foncées sur fond bleu clair.

— réactif pour la révélation des polyols (inositol, glycérol...) (159)
  — 1 ml d'une solution saturée de $AgNO_3$
  — 100 ml d'acétone

Il se forme un précipité qui disparaît en ajoutant quelques gouttes d'eau. La feuille est plongée pendant 5 minutes dans cette solution, et ensuite dans de l'éthanol contenant 5 % de soude. Il apparaît des taches brunes sur fond brun clair.

— réactif à la ninhydrine en solution à 0,1 % dans le butanol saturé d'eau. (160).

Autres révélateurs :

— vapeurs d'iode, bleu de bromothymol en solution à 1% dans de la soude N/10.
— acide sulfurique concentré.
— solution de 0,01 % de Rhodamine B dans une solution 0,25 M de $NaPO_4H_2$.

4°) *Chromatographie en phase gazeuse.*

Les esters méthyliques des acides gras ont été analysés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse à différentes températures avec un appareil F & M 720. Les phases stationnaires sont, soit le caoutchouc de silicone à 5% (phase S), soit le polyester de succinate de diéthylèneglycol à 10% (phase P), soit le succinate de butanediol à 10 % (phase BDS). La technique est décrite dans le chapitre «Acides gras libres».

— appareil F & M 500 : température d'injection 250°, température de sortie 250°, programmation 2,9°/min de 160° à 200° ou 250°; les phases stationnaires sont soit du caoutchouc de silicone DC 550 à 5% soit le succinate de butanediol à 15%, le support étant la célite et la longueur des colonnes de 3 m et 2,5 m.

Pour étudier les acides gras non identifiés par les moyens habituels, on les piège à la sortie de l'appareil dans un tube refroidi en forme de V.

B - *DOSAGES*

1°) *Dosages des acides aminés*
selon TROLL et CANNAN (161)

Le mélange réactionnel (0,5 ml de solution contenant les acides aminés, 1 ml de solution contenant 2% de KCN, 0,01 M et 98% de pyridine, 1 ml de solution phénolique à

80%) est placé dans un bain-marie bouillant. Dès que le mélange a atteint la température du bain-marie, on ajoute 0,2 ml de ninhydrine en solution alcoolique à 5%. On chauffe 5 minutes, on refroidit, puis on dilue avec de l'alcool (à 60 %) à 10 ml et mesure la coloration à 570 mμ.

2°) *Dosage du glycérol* selon FAURE (162)

Après précipitation des sucres par le sulfate de cuivre à 20% et la chaux, le dosage est pratiqué sur la solution par oxydation périodique et la lecture est faite au spectrophotomètre à 530 mμ en présence d'acide chromotropique (acide dihydro-1,8 naphtalène disulfonique-3,6) avec comme témoins des solutions de glycérol contenant 40 à 500 γ/ml.

3°) *Dosage du phosphore*
selon MACHEBOEUF et DELSAL (163)

Ce dosage est basé sur la transformation des ions phosphates en phosphomolybdate et sur la coloration bleue qui se développe en présence d'un réducteur. La courbe d'étalonnage a été établie avec une solution de phosphate monopotassique.

4°) *Dosage de l'azote.*

L'azote a été dosé d'après la méthode de KJELDAHL avec un appareil de PARNAS WAGNER. Nous avons travaillé avec des quantités de l'ordre du mg.

C - *TECHNIQUES PHYSIQUES*

1°) Point de fusion : mesuré avec un microscope à platine chauffante Köfler.

2°) Pour la mesure de l'indice de réfraction, nous nous sommes servis d'un réfractomètre du type d'Abbe (OPL).

3°) Les spectres I.R. ont été effectués sur un Perkin Elmer mod. 21 ou Infracord entre lames de NaCl pour les liquides, ou en solution dans le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone (cellules de 0,1 mm d'épaisseur) pour les solides et certains liquides. D'autres spectres,

en particulier pour la deuxième partie de ce travail, ont été réalisés avec un appareil Unicam dans les solvants CCl_4 ou CS_2.

4°) Les spectres U.V. ont été réalisés soit sur un appareil Beckman DK2, soit sur Beckman DB, dans le cyclohexane avec des cellules de 1 cm d'épaisseur.

5°) Les spectres de R.M.N. ont été réalisés avec un appareil Varian A 60 et interprétés à l'Institut de Chimie à Strasbourg ou à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette.

6°) Les spectres de masse ont été réalisés à Gif-sur-Yvette avec un appareil Atlas CH_4 (potentiel d'ionisation : 70 V, température d'introduction 160° à 200°, température de la source d'ions 270°) ou sur appareil MS 9 (potentiel d'ionisation 70 V, introduction directe, température de la source d'ions 180°).

7°) Le pouvoir rotatoire a été mesuré avec un appareil Zeiss (cellules de 0,5 ml, longueur 1 cm, solutions chloroformiques contenant 1% de produit.)

PREMIERE PARTIE

Etude des lipides de la forme L stable de Proteus P_{18}

Comparaison avec la bactérie d'origine

CHAPITRE I

Extraction et fractionnement des lipides

Nous avons utilisé des formes L stables de *Proteus mirabilis* (P_{18}) dont l'étude, entreprise depuis de nombreuses années dans notre laboratoire, a montré qu'elles sont dépourvues de paroi rigide (164 à 166) et contiennent des quantités importantes de lipides, responsables de réactions tissulaires analogues à celles obtenues avec les Mycobactéries (48).

Pour extraire et fractionner les lipides, nous avons choisi la technique mise au point par ANDERSON, puis par ASSELINEAU et LEDERER pour les Mycobactéries, bien que nous ayons travaillé avec un matériel différent.

I - *Obtention des bactéries*

Les formes L et les formes bactériennes normales ont été cultivées et récoltées, comme nous l'indiquons dans la partie expérimentale (page 28), sur milieu synthétique, liquide pour les premières, solide (gélosé) pour les secondes. Le temps d'incubation est de 24 heures pour les bacilles et de 7 jours pour les formes L. Nous avons choisi les conditions de culture qui nous donnaient le rendement maximum. Ce rendement varie de 0,5 à 1 g par litre de milieu de culture, réparti dans 50 flacons, pour les formes L et de 1,5 à 2 g par litre, réparti dans 10 boîtes de Roux, pour les formes bactériennes.

Nous avons ainsi travaillé sur des quantités de 50 g de formes L ou de P_{18} lyophilisées, obtenues après 3 mois de culture. Cette quantité a cependant été insuffisante pour une étude plus complète de certaines fractions de lipides ou de constituants en proportion très faible.

II - *Comparaison de la forme L et de la forme bactérienne normale*

Les conditions de culture ne sont pas exactement identiques pour les deux variétés de microorganismes ; l'état physiologique des germes peut donc être affecté et la composition chimique être différente.

La composition chimique globale des deux souches a été déterminée simultanément sur des récoltes lyophilisées.

Le tableau II résume les résultats globaux obtenus dans deux séries d'expériences.

TABLEAU II

Composition chimique globale des formes bactériennes d'origine (P_{18}) et des formes L (F.L.)

Teneur des bactéries desséchées à 105°	P_{18}		F. L.	
	1e série d'expériences	2e série d'expériences	1e série d'expériences	2e série d'expériences
en azote	11,0%	12,0%	6,0%	7,0%
en phosphore	1,7%	1,4%	5,4%	5,0%
en cendres	11,0%	9,3%	32,0%	30,0%

Composition par rapport au poids sec (sans cendres) des microorganismes	P_{18}		F. L.	
	1e série d'expériences	2e série d'expériences	1e série d'expériences	2e série d'expériences
en protéines	56,6%	55,5%	50,0%	54,6%
en sucres	12,0%	11,1%	4,4%	5,0%
en lipides	9,4%	9,4%	30,0%	23,5%
en acides nucléiques	20,0%	22,0%	14,7%	12,9%

1re série d'expériences : 5 récoltes différentes
2me série d'expériences : 4 récoltes différentes

La concordance des résultats des deux séries d'expériences est bonne dans le cas des formes normales ; les divergences que nous trouvons dans la composition des formes L peuvent s'expliquer par le fait que nous n'avons pas lavé les formes L à cause de la fragilité de leur enveloppe et de sa perméabilité plus grande.

La teneur plus faible en azote dans le cas des formes L s'explique de la même façon : leur lyse partielle, inégale, entraîne le passage d'une fraction (protéines, acides nucléiques) dans le milieu de culture. Le pourcentage en phosphore est plus élevé, mais cette augmentation n'est qu'apparente, 55% du phosphore étant sous forme minérale, ce qui apparaît également par l'augmentation de la teneur en cendres.

III - *Extraction et fractionnement des lipides*

Dans le tableau III nous donnons nos résultats pour les formes L et les formes bactériennes normales lyophilisées. A titre de comparaison, nous avons joint les données obtenues, avec la même technique, par ASSELINEAU (22) pour le bacille tuberculeux.

TABLEAU III

Comparaison de la teneur en lipides des formes L et des formes bactériennes normales lyophilisées

	F. L.	P_{18}	Bacille tubercul. Souche Test humaine	Bacille tubercul. Souche H 37 Ra
Acides gras libres	5,70%	0,24%	7,3%	5,6%
Graisses neutres	7,88%	0,60%		
Phospholipides	1,90%	0,60%	0,8%	1,8%
Cires A	2,92%	4,75%	4,2%	2,2%
Cires chloroformiques	6,20%	0,76%	9,2%	6,5%
Lipides libres totaux	24,60%	6,95%	21,5%	16,1%
Lipides liés	0,80%	1,05%	4,7%	

D'une manière générale, la teneur en lipides est plus faible chez les formes bactériennes normales, à l'exception des cires A et, dans une plus faible mesure, des lipides liés.

Cette augmentation de lipides dans les formes L peut être due :

— 1) aux conditions de culture(47). Les formes L ne sont récoltées qu'après 7 jours, alors que les formes normales le sont après 24 heures d'incubation.

— 2) à la structure particulière de l'enveloppe des formes L permettant le passage des substances hydrosolubles et facilitant l'extraction des lipides.

— 3) enfin à un métabolisme différent de celui des formes bactériennes normales.

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT

I - *OBTENTION DES BACTERIES*

1°) *Les formes L*

Les formes L sont ensemencées selon la technique de TULASNE (167) sur milieu de MEDILL et O'KANE (168) modifié (169).

La composition en est la suivante (g par litre de milieu):

KH_2PO_4	1
K_2HPO_4	9
$(NH_4)_2SO_4$	1
Lactate de Na (60% Prolabo)	33,3
Amide nicotinique	0,001
$MgSO_4, 7H_2O$	0,080
Na Cl	0,004
$FeSO_4, 7H_2O$	0,004
$MnSO_4, 4H_2O$	0,016

4 ml d'une solution de pénicilline G (à 100.000 unités par ml) sont ajoutés

Le milieu est réparti en flacons de 100 ml à raison de 25 ml par flacon. La semence est déposée avec une öse à la surface du liquide (167). Les flacons sont incubés 7 jours à 37°. A ce moment, la culture en voile a envahi toute la surface du liquide.

2°) *Les formes bactériennes normales*

Elles sont ensemencées sur milieu solide de même composition, mais sans pénicilline. Le milieu contient de l'agar-agar à la concentration de 2,5%. Il est réparti dans des boîtes de Roux de 1 l contenant chacune 100 ml de milieu.

L'ensemencement se fait avec 1 ml d'une culture bactérienne émulsionnée dans de l'eau physiologique, répartie sur le milieu solide. Les boîtes de Roux sont ensuite placées à 37° pendant 24 heures.

RECOLTES

a) *Formes L* — Centrifugation à 6000 tours/minute pendant 1/2 heure du milieu de culture. Le culot est recueilli et lyophilisé pendant 24 heures.

b) Formes bactériennes normales : 5 à 10 ml d'eau distillée et des billes de verre (diamètre 0,6—0,8 cm) sont ajoutées dans chaque boîte de Roux. On agite pour détacher les bactéries qui sont mises en suspension dans l'eau, puis on centrifuge à 6000 tours/minute pendant 30 minutes.

Après un lavage par l'eau, le culot de centrifugation est lyophilisé pendant 24 heures.

II - *COMPOSITION CHIMIQUE*

1°) *Perte de poids à 105°*

On chauffe un creuset en porcelaine à 105° jusqu'à poids constant. Puis 2 g de bactéries lyophilisées y sont pesés et chauffés de nouveau à 105° jusqu'à poids constant. On obtient ainsi dans deux séries d'expériences des pertes de poids de 80 et 238 mg dans le cas de P_{18}, et de 260 et 147 mg pour les formes L.

2°) *Cendres*

Le matériel desséché est calciné à 105° jusqu'à poids constant. Le poids des cendres est de 10 mg pour 90 mg de P_{18} desséché et de 15 mg pour 162 mg de P_{18} dans la deuxième série d'expériences. Il est de 36 mg pour 113 mg de F.L. et de 40 mg pour 150 mg de F.L. dans la deuxième série d'expériences.

3°) *Dosage des protéines selon LOWRY (170) avec le réactif de FOLIN-CIOCALTEU (171).*

La courbe de référence a été établie avec des solutions d'albumine de boeuf de concentration variant entre 0,1 et 0,6 mg/ml. La lecture se fait à 500 mμ. La teneur en protéines exprimée en pourcentage d'albumine est de 51 % et de 50,5% dans le cas de P_{18} et varie dans le cas des formes L de 33,5% à 38% d'une série d'expériences à l'autre.

4°) *Dosage des sucres totaux par l'orcinol (172)*

La courbe de référence a été établie avec des solutions de glucose de concentration 0,1 à 0,5 mg/ml. La lecture se fait à 510 mμ.

Les résultats sont consignés dans le tableau IV suivant :

TABLEAU IV

Pourcentages des sucres totaux dans les P_{18} et dans les F.L.

	Quantités de bactéries utilisées en g	Poids des sucres en g	% par rapport au poids de bactéries desséchées à 105°
1ère série d'expériences			
P_{18}	2,1	0,210	10
F. L.	2,0	0,060	3
2me série d'expériences			
P_{18}	2,0	0,220	10,1
F. L.	1,9	0,066	3,5

5°) *Dosage des acides nucléiques selon SCHMIDT et THANNHAUSER (173).*

Cette détermination a été effectuée sur des quantités de 20 à 50 mg de microorganismes délipidés, en dosant le phosphore, le ribose et le désoxyribose, et en se reportant à des courbes de référence établies avec de l'A.R.N. de levure et de l'A.D.N. de thymus (concentrations variants de 0,01 à 0,100 mg de P/ml).

On obtient ainsi 18 à 20% d'acides nucléiques pour P_{18} et 9 à 10% pour F. L..

6°) *Teneur en lipides libres*

1 g de matière desséchée à 105° est traité par le mélange chloroforme, méthanol, dans les proportions de 2 à 1 (v/v). Après plusieurs extractions successives nous obtenons les résultats suivants :

TABLEAU V

Teneur en lipides

	Quantités de bactéries utilisées en g	Poids des lipides extraits en g	% par rapport au poids des bactéries desséchées à 105°
1ère série d'expériences			
P_{18}	0,977	0,083	8,5
F. L.	0,870	0,187	21
2me série d'expériences			
P_{18}	1,000	0,086	8,6
F. L.	0,912	0,151	16,5

III - *EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES LIPIDES*

A - *Cas des formes L.*

1°) *Extrait éthéro-alcoolique (acides gras libres, graisses neutres, phospholipides, cires A)*

50 g de bactéries lyophilisées sont extraits plusieurs fois avec 500 ml du mélange d'éther et d'éthanol (50/50 en volume) jusqu'à ce que la quantité de substance extraite

soit inférieure à 10 mg. On extrait ainsi 10 g de substance qui sont traités dans 150 ml d'éther. Une partie ne se dissout pas, elle a été conservée pour une étude ultérieure. Un examen préliminaire (chromatographie sur couche mince) montre la présence de sucres et d'acides aminés.

a) *Purification*

La phase éthérée (150 ml) est ensuite filtrée sur filtres millipores (50 mμ), puis lavée avec 100 ml d'eau. Il se forme une émulsion qui est brisée en ajoutant 2 à 3 volumes d'acétone et une solution de NaCl à 18 %, goutte à goutte jusqu'à ce que l'émulsion se casse. On évapore à sec et on recommence le lavage.

b) *Fractionnement*

9,2 g d'extraits éthéro-alcooliques sont ensuite traités plusieurs fois pendant 20 minutes par des fractions de 200 ml d'acétone à ébullition jusqu'à ce que l'acétone ne dissolve plus de quantités appréciables (10 mg) de lipides. La partie insoluble à chaud est constituée par des phospholipides (0,95 g). Des solutions acétoniques réunies, laissées pendant 12 heures à 4°, on recueille la partie insoluble : 1,46 g de cires A. La fraction soluble dans l'acétone à froid contient les acides gras libres et les graisses neutres (poids 6,79 g). La séparation est décrite dans le chapitre II.

2°) *Extrait chloroformique (cires B,C,D)*

Après extraction par le mélange alcool-éther le résidu bactérien est repris chaque fois par 500 ml de chloroforme jusqu'à épuisement. Le poids de l'extrait chloroformique est de 3,1 g.

a) *Purification*

L'extrait chloroformique est évaporé à sec, repris par 100 ml d'éther et lavé 3 fois par 50 ml d'eau. Il ne se produit pas d'émulsion. Après évaporation à sec, le résidu est repris par du chloroforme et filtré sur poudre de cellulose (25 g). Les cires ainsi purifiées pèsent 3,0 g.

b) *Fractionnement*

1,6 g des cires brutes sont dissous dans 30 ml d'éther; lorsqu'on ajoute 30 ml de méthanol, on précipite les cires

C et D. Le précipité est repris par de l'acétone bouillante : la partie insoluble, soit 0,750 g, constitue les cires D, et les cires solubles dans l'acétone à chaud sont les cires C (0,170 g).

La solution éthéro-méthanolique est évaporée à sec. Son poids est de 0,610 g, ce sont les cires B.

3°) *Lipides liés*

Le résidu bactérien provenant de l'extraction précédente est extrait par du chloroforme contenant 1% d'acide chlorhydrique. Les lipides liés extraits pèsent 0,4 g. Après dissolution dans 15 ml d'éther et lavage par de l'eau, comme dans le cas précédent, ils ont été étudiés qualitativement.

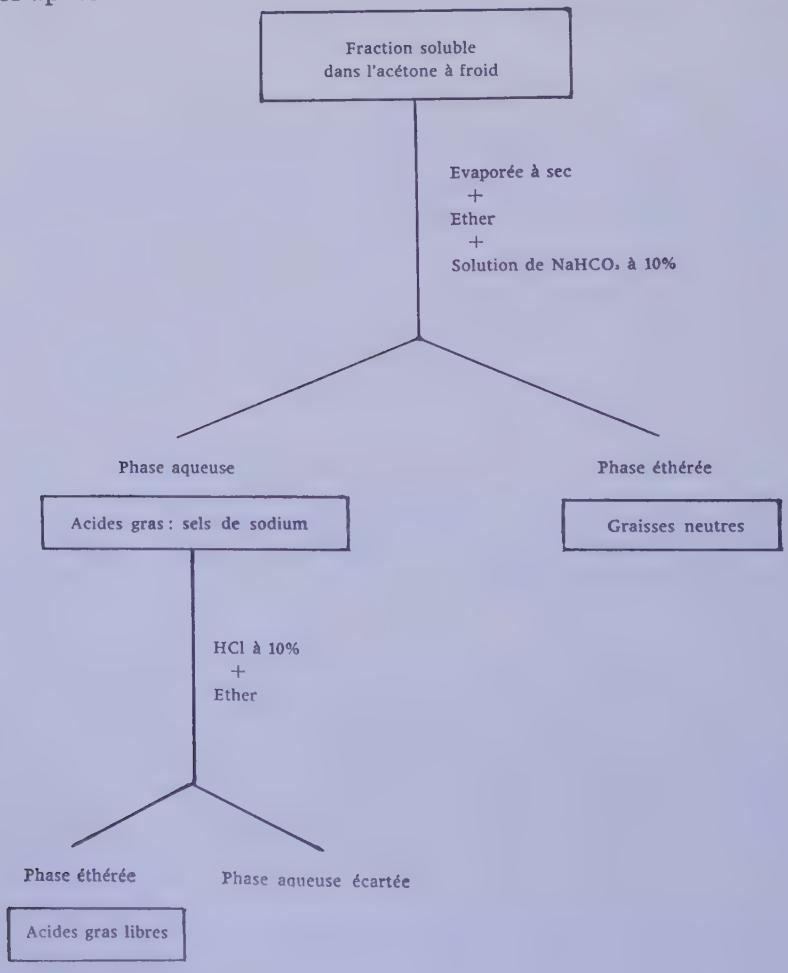
B - *CAS DES FORMES BACTERIENNES NORMALES*

Les lipides des formes bactériennes normales ont été extraits de la même façon. Les résultats sont donnés dans le tableau III avec ceux des formes L qui en dérivent.

CHAPITRE II

Les acides gras libres

La fraction soluble dans l'acétone est séparée en acides gras libres et en graisses neutres. L'acétone est évaporée et le résidu repris par de l'éther. La séparation des graisses neutres et des acides gras libres se fait suivant le schéma ci-après :



L'étude des acides gras libres a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques obtenus par action d'une solution éthérée de diazométhane ou par action du mélange méthanol, trifluorure de bore sur les acides, selon SCHMITZ et METCALFE (174). Cette dernière technique nous a servi essentiellement de contrôle et n'a pas montré de différence avec la méthode au diazométhane.

Le mélange des esters a été analysé par chromatographie en phase gazeuse, dans tous les cas sur deux phases stationnaires et parfois sur trois : caoutchouc de silicone (phase S, apolaire), polysuccinate de diéthylèneglycol (phase P, polaire), polysuccinate de butanediol (phase BDS, polaire).

Avant d'entreprendre cette étude nous avons étalonné l'appareil avec des mélanges d'esters témoins, fournis gracieusement par le National Institutes of Health. Ces mélanges comprennent :

a) des esters d'acides gras normaux à nombre pair d'atomes de carbone de C_{10} à C_{20} (mélange C).

b) des esters d'acides gras normaux insaturés et saturés en C_{16} et C_{18} (mélange D).

Les résultats de la chromatographie des esters témoins sont résumés dans le tableau VI. Nous y comparons les résultats donnés par l'intégrateur à disque de l'appareil et ceux obtenus par pesée des différents constituants des mélanges.

L'indice de rétention relatif est calculé par rapport au palmitate de méthyle. Nous le définissons par

$$n = \frac{\text{temps de rétention de l'ester inconnu}}{\text{temps de rétention du palmitate de méthyle}}$$

La réponse de l'enregistreur correspond d'après les résultats consignés dans le tableau précédent aux quantités injectées dans l'appareil, même lorsqu'on change de phase stationnaire. D'après ces résultats il nous a paru inutile de calculer des facteurs de correction.

Afin d'éviter cependant de trop grandes variations nous avons fait les analyses des esters naturels dans les mêmes

conditions que pour les mélanges témoins et en vérifiant régulièrement l'étalonnage de notre appareil.

TABLEAU VI

Indices de rétention relatifs et composition des mélanges d'esters témoins

Mélange C	Phase S		Phase P		Phase BDS	
	n	% mesuré	n	% mesuré	n	% mesuré
C_8 (1,5%)	0,06	1,5	0,12	1,4	0,08	1,5
C_{10}(3,0%)	0,12	3,1	0,18	2,7	0,14	2,8
C_{12}(6,0%)	0,24	5,8	0,31	6,2	0,23	5,9
C_{14}(12,0%)	0,48	11,9	0,51	12,5	0,55	12,1
C_{16}(19,4%)	1,00	19,8	1,00	20	1,00	19,5
C_{18}(25,0%)	1,80	24,4	1,72	25,2	1,75	25,4
C_{20}(33,1%)	4,00	33,5	2,67	32	3,00	32,5
Mélange D						
C_{14}(11,8%)	0,48	12	0,51	12	0,55	11,5
C_{16}(23,6%)	1,00	29	1,00	22	1,00	23,1
*C_{16} :1(6,8%)	1,00	29	1,14	6,3	1,15	6,5
C_{18}(13,1%)	1,75	59	1,72	13	1,75	12,7
**C_{18} :1(44,6%)	1,75	59	2,00	45,0	1,93	44

*C_{16} :1 signifie ester monoinsaturé en C_{16}
**C_{18} :1 signifie ester monoinsaturé en C_{18}

Résultats

L'analyse du mélange des esters méthyliques de la forme L montre que ce mélange comprend des esters d'acides saturés en C_{12}, C_{14}, C_{16}, C_{18}, des esters d'acides monoinsaturés en C_{16} et C_{18} et d'un ester d'acide particulier à environ 17 atomes de C (tableau VII et chromatogrammes 1 et 2). Tous ces esters ont été étudiés par comparaison des indices de rétention avec ceux de témoins et cochromatographie, c'est-à-dire chromatographie avec des témoins internes.

TABLEAU VII

Indices de rétention relatifs (n) et pourcentage des esters naturels

Pic N°	n			% relatifs		
	phase S	Phase P	ph. BDS	phase S	Phase P	ph. BDS
1	0,24	0,31	0,23	2,3	1,8	2
2	0,48	0,51	0,55	12,6	11,5	12
3	1	1	1	63	47,4	48
4		1,14	1 15		13,7	14
5	1,26	1,40	1,47	10,8	12	11
6	1,80	1,72	1,75	11	3,5	2,9
7		2,05	1,927		8,5	8

Afin de contrôler ces résultats nous avons recueilli séparément chacun de ces esters à la sortie de l'appareil pour une étude plus complète.

I - *Esters méthyliques d'acides gras normaux saturés*

L'ester correspondant au 1er pic est le laurate de méthyle (liquide; n^{45}: tr. 1,4219, th. 1,4220). Le spectre I.R. est identique à celui du laurate de méthyle témoin.

Le 2me pic correspond au myristate de méthyle (F=18°, th. 19°; n^{45}:tr. 1,4290, th. 1,4281). Son spectre I.R. est superposable à celui du myristate de méthyle témoin.

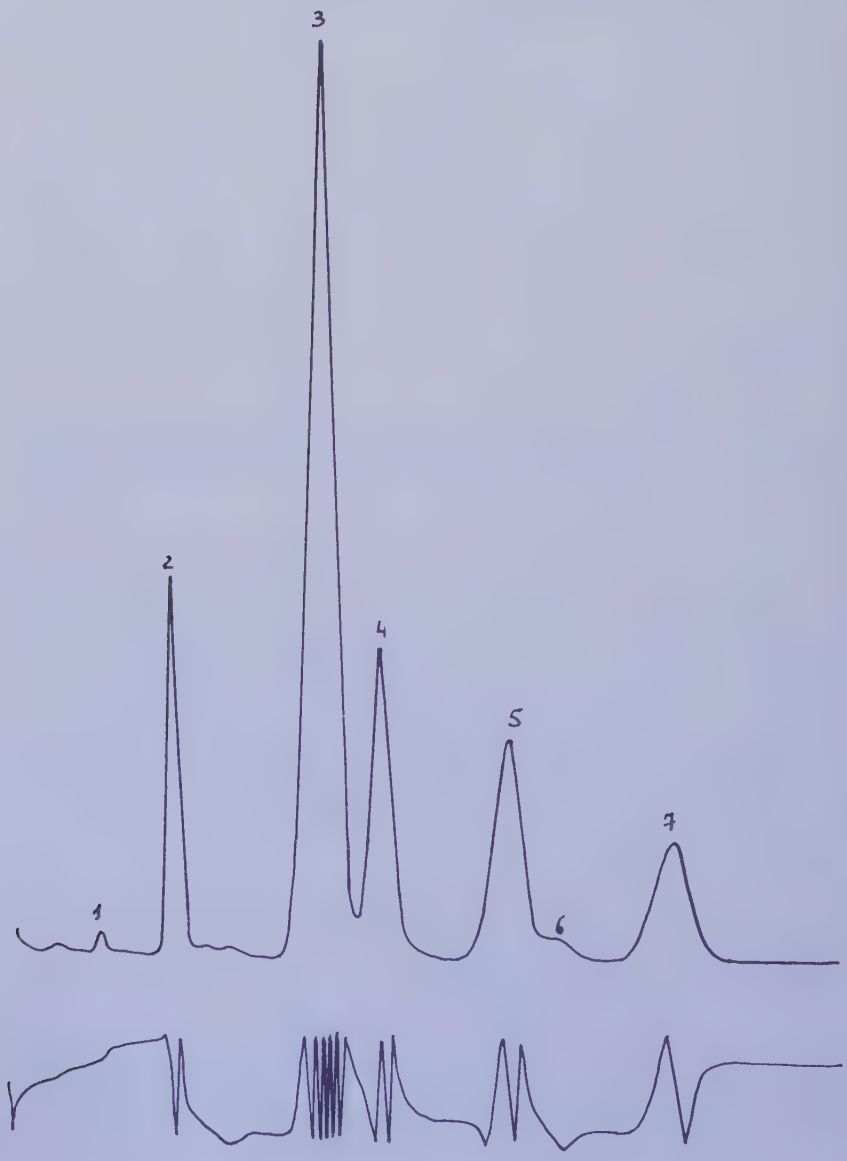
Le 3me pic est celui du palmitate de méthyle (F=29°, th. 29°5; n^{45} tr. 1,4315, th. 1,4317).

Le 6me pic correspond au stéarate de méthyle (F=37° th. 38°; n^{45}:tr. 1,4345, th. 1,4346). Le spectre I.R. est le même que celui du stéarate témoin.

De plus, les indices de rétention de ces esters sur phase P restent les mêmes après hydrogénation ou traitement par le brome. Ils sont totalement et facilement inclus dans l'urée, ce qui confirme la structure linéaire de la chaîne hydrocarbonée.

CHROMATOGRAMME 1 - Colonne P
température 200°

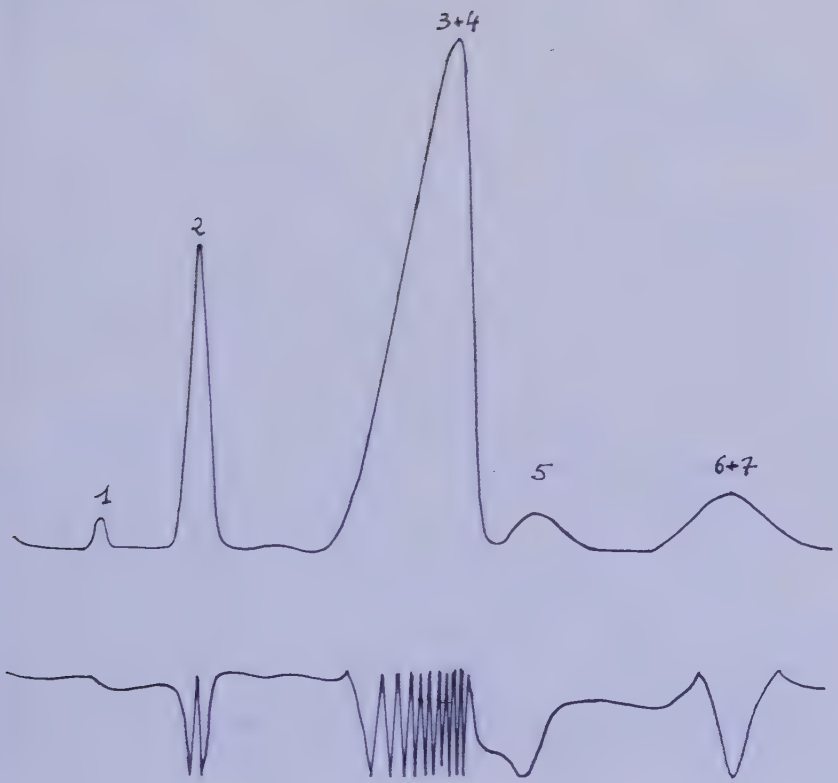
Mélange d'esters méthyliques des acides gras libres des formes L de P_{18}



CHROMATOGRAMME 2 - Colonne S

température 200°

Mélange d'esters méthyliques des acides gras libres des formes L de P_{18}



II - *Esters d'acides gras normaux insaturés*

Lorsqu'on analyse par chromatographie en phase gazeuse sur phase P les produits d'hydrogénation du mélange d'esters, les pics 4 et 7 correspondant à deux esters disparaissent. Les pics des esters saturés correspondants augmentent (tableau VIII).

TABLEAU VIII

Composition du mélange des esters avant et après hydrogénation

PICS / Composition en %	1	2	3	4	5	6	7
	C_{12}	C_{14}	C_{16}			C_{18}	
Avant hydrogénation ..	1	13	50	13	11	1	8
Après hydrogénation ..	1	14	66	0	10	8	0

Ces pics disparaissent également lorsqu'on traite le mélange par du brome dans l'éther.

Le pic 4 (liquide; n^{26}: tr. 1,4460, th. 1,4463) est celui du palmitoléate de méthyle. Son spectre de masse présente un pic à m/e=236 attribué au fragment M-32 (175,176); sa masse moléculaire est donc de 268. Son spectre I.R. est identique à celui du palmitoléate de méthyle.

Le spectre I.R. entre lames de NaCl de l'acide correspondant, isolé après saponification de l'ester, présente des bandes dans la région 1100 cm^{-1} à 1400 cm^{-1}, dont le nombre N est égal à 8. On en déduit n, nombre d'atomes de carbone de la chaîne, égal à 16 (d'après MEIKLEJOHN et coll. 177).

L'hydrogénation quantitative selon CLAUSON-KAAS et LIMBORG (178) montre qu'il faut 1 mole d'H_2 par mole d'ester. Le spectre de masse de l'ester hydrogéné (F=29°) présente un pic moléculaire à m/e=270, ce qui confirme la monoinsaturation. D'autres pics présents dans le spectre, attribués aux fragments $(CH_2)_n$ - $COOCH_3$ (75, 76) en particulier à m/e=143 et 74, montrent qu'il s'agit d'un composé linéaire.

La dégradation de l'ester méthylique, soit par oxydation permanganique, périodique (62, 179), soit par ozonolyse se-

lon CRIEGEE (180), permet de localiser la double liaison en 9, 10. En effet, dans les produits d'ozonolyse transformés en acides par action de l'oxyde d'argent, selon ASINGER (181), puis estérifiés par le diazométhane, nous avons identifié par chromatographie en phase gazeuse sur deux phases (S et P) l'azélaate et l'heptanoate de méthyle.

Le pic 7, (liquide; n^{26}: tr. 1,4520, th. 1,4522) est celui de l'oléate de méthyle. Il a été étudié de la même manière que le palmitoléate de méthyle. Sur le spectre de masse le pic attribué à M-32 est à m/e=264.

Le spectre I.R. de l'acide, obtenu après saponification de l'ester, présente N=9 bandes dans la région 1100 cm^{-1} à 1400 cm^{-1}; d'où n=18.

L'hydrogénation quantitative montre ici aussi qu'il faut 1 mole d'H_2 par mole d'ester. Le spectre de masse du produit hydrogéné (F=37°) présente des pics à m/e = 298, 143, 74. Il s'agit donc de stéarate de méthyle.

L'ozonolyse dans les mêmes conditions que précédemment permet de localiser la double liaison en 9, 10. Nous avons identifié dans les produits d'oxydation les acides azélaïque et pélargonique.

La configuration «cis» des deux esters monoinsaturés est déduite de l'identité des spectres I.R. avec ceux d'esters témoins et par la difficulté d'inclusion de ces deux esters dans l'urée. Selon ASSELINEAU (56) les produits «trans» s'incluent plus facilement.

III - *Esters méthyliques en C_{17} à noyau cyclopropanique*

Le temps de rétention de ce dernier produit (pic 5) est légèrement inférieur sur phase S à celui de l'ester de l'acide en C_{17} témoin, légèrement supérieur sur phase P. (tableau IX).

TABLEAU IX

Indices de rétention relatifs de l'ester en C_{17} normal et du produit du pic 5.

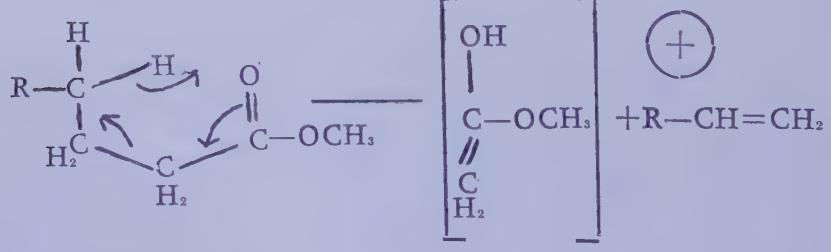
n	C_{17} normal	pic N° 5
Sur S	1,29	1,26
Sur P	1,20	1,40

Cet ester n'est pas inclus dans l'urée. Le traitement par le brome ou l'hydrogénation dans les conditions d'hydrogénation des esters insaturés ne change pas son temps de rétention. Par contre, l'action de l'acide bromhydrique fait disparaître le pic correspondant sur le chromatogramme. Des essais d'acétylation ne modifient pas son temps de rétention ; le spectre I.R. du produit acétylé est le même que celui du produit de départ.

L'absence sur le spectre I.R. de bandes à 3600 cm^{-1} exclut la présence de groupement OH. La présence d'une bande à 1025 cm^{-1} par contre, est en faveur du noyau cyclopropanique (182).

Le spectre de R.M.N. présente des signaux centrés à 35 cps et à - 18 cps, (le tétraméthylsilane étant la référence interne), attribués à des protons de cycles propaniques (183). La comparaison des surfaces du singulet à 217 cps, attribuable aux protons du groupement méthyle du radical $COOCH_3$ et du signal à 35 cps montre qu'il n'y a qu'un seul cycle propanique.

Le spectre de masse présente un pic à m/e=125 déjà constaté par TOUBIANA (184) sur le spectre du méthylène-9, 10 hexadécanoate de méthyle synthétique. Ce pic est attribué au fragment résultant de la coupure de la chaîne en 8, 9 à côté du cycle. Il existe sur le spectre d'autres pics à m/e=111, 97, 83, 69, 55 ainsi que à m/e=197, 166, 155 et 124 dus aux fragments résultant de coupures à côté du cycle, qui se trouverait donc en 9, 10. Le pic à m/e=74 existe également et provient du réarrangement



Enfin le pic à m/e=250 correspond à M-32, le cycle se comportant comme une insaturation.

La présence d'un noyau cyclopropanique nous a incité à changer les conditions d'hydrogénation (182, 185) : 40° pendant 10 heures à la pression atmosphérique, ou 60° pendant 2 heures dans un autoclave à la pression de 120 kg/cm². Dans ces conditions le cycle est ouvert. Dans les produits d'hydrogénation, nous avons identifié par chromatographie en phase gazeuse une faible proportion d'heptadécanoate de méthyle (environ 13%).

Un deuxième pic apparaît sur le chromatogramme ; d'après son temps de rétention il s'agit d'esters ramifiés (tableau X).

TABLEAU X

Indices de rétention relatifs des produits d'hydrogénation comparés à celui de l'heptadécanoate de méthyle et à celui du pic 5

n	Témoins		Produits d'hydrogénat.	
	C_{17} normal	pic 5	pic a	pic b
Sur S	1,29	1,26	1,25	1,29
Sur P	1,20	1,40	1,12	1,20
Composition sur P		0	87 %	13 %

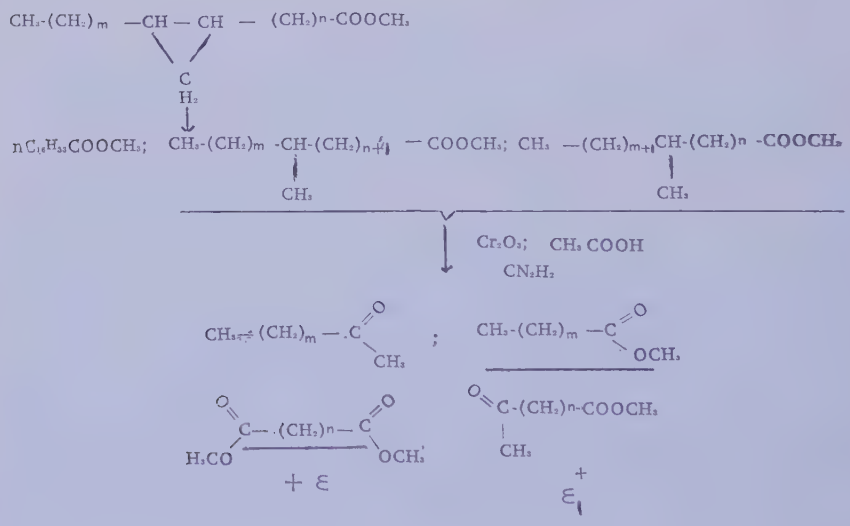
Le pic b correspond à l'heptadécanoate de méthyle (même indice de rétention relatif sur les deux phases P et S).

Le produit du pic «a» représente environ 85% du mélange et a été piégé. Ce produit n'est pas inclus dans l'urée. Sur le spectre I.R. l'intensité de la bande à 1370 cm^{-1} (groupes CH_3) a augmenté presque du double par rapport à l'ester en C_{17} à noyau cyclopropanique. Il s'agit donc d'esters ramifiés.

Afin de le confirmer, nous avons effectué sur ces esters ramifiés l'oxydation chromique selon CASON et

FESSENDEN(65). La chromatographie en phase gazeuse des produits de dégradation, traités par le diazométhane, a permis d'identifier parmi de nombreux pics deux esters : l'heptanoate de méthyle et l'azélaate de méthyle.

L'hydrogénation a donc ouvert le cycle pour donner une faible proportion d'heptadécanoate de méthyle et un mélange d'esters ramifiés. Ces esters ramifiés sont le méthyl-9, hexadécanoate et le méthyl-8, hexadécanoate de méthyle, donnant par oxydation chromique plus particulièrement l'heptanoate et l'azélaate de méthyle, selon les réactions :



IV. *Comparaison des acides gras libres des formes L et des formes bactériennes normales*

Nous avons isolé dans le cas de la souche bactérienne d'origine 3% d'acides gras libres par rapport aux lipides totaux, alors que dans le cas des formes L nous en avons trouvé 7%. Cette teneur plus importante chez les formes L peut s'expliquer par l'hydrolyse partielle des lipides ou, selon VACZI et FARKAS (186), par action de la pénicilline qui inhiberait l'action de certains enzymes (ésterases).

Le tableau XI indique les résultats obtenus avec les mêmes techniques dans le cas des deux formes.

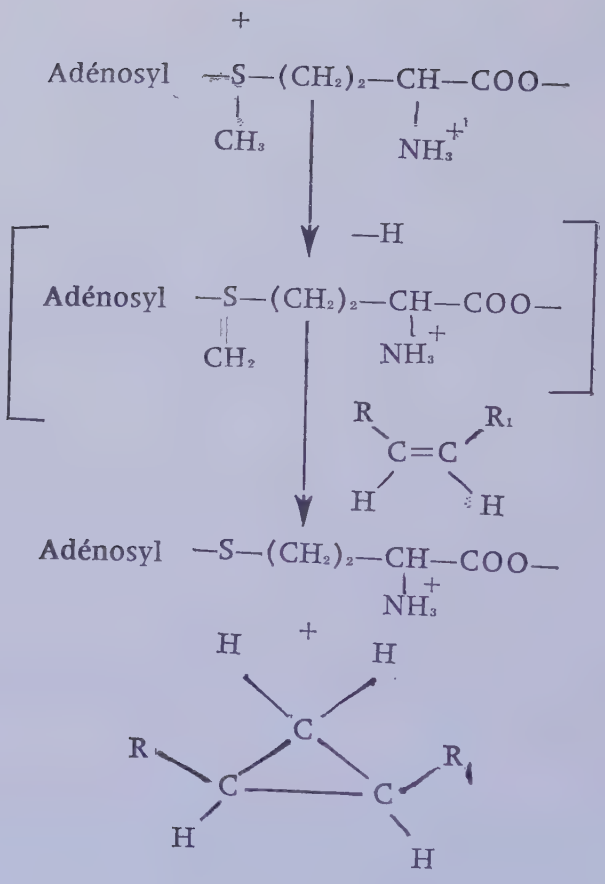
TABLEAU XI

Pourcentage des acides gras libres dans les formes L et les formes bactériennes normales

Acide en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17} cyclique	C_{18}	$C_{18}:1$
	%	%	%	%	%	%	%
P_{18}	1	9	46	21	3	2	16
F.L.	2	11,5	47	14	12	4	9

Les formes L contiennent des proportions d'acides insaturés plus faibles, d'acide méthylène-9, 10 hexadécanoïques plus fortes que les bactéries d'origine.

La différence des conditions de culture peut expliquer ces variations. MARR et INGRAHAM (27) ont en effet démontré avec *Escherichia coli* que ces acides contenant un noyau cyclopropanique apparaissent à la fin de la phase de croissance exponentielle. Les variations du temps d'incubation (24 heures pour les formes normales) expliqueraient l'inversion des proportions d'acide palmitoléique et d'acide méthylène-9, 10 hexadécanoïque par rapport aux proportions des mêmes acides dans le cas des formes L (incubation de 7 jours). On admet, en effet, (58, 187, 188) que la synthèse de l'acide en C_{17} contenant un noyau cyclopropanique se fait à partir de l'acide insaturé en C_{16} par addition d'un radical méthylène provenant de l'Adénosyl-S-méthionine suivant la réaction :


Adénosyl
—S—(CH₂)₂—CH—COO—
CH₃
NH₃
—H
Adénosyl
—S—(CH₂)₂—CH—COO—
CH₂
NH₃
R
R₁
C=C
H
H
Adénosyl
—S—(CH₂)₂—CH—COO—
NH₃
H
H
C
R
C
C
R
H
H

LES ACIDES GRAS LIBRES

Ils ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse sous forme d'esters méthyliques.

I) *Extraction*

Pour séparer les acides gras libres des graisses neutres on dissout 6,79 g d'acétonosoluble dans 100 ml d'éther. Cette solution est agitée plusieurs fois avec 100 ml d'une solution de $NaHCO_3$ à 10% dans une ampoule à décanter. Finalement on lave la phase aqueuse avec de l'éther et la phase éthérée avec de l'eau, jusqu'à pH=7.

La phase éthérée contient les graisses neutres, elle est séchée sur Na_2SO_4 anhydre.

La phase aqueuse contenant les sels de sodium des acides gras est acidifiée à pH=1 avec HCl à 10%. On sépare ainsi les acides gras libres qui sont extraits par de l'éther et séchés sur Na_2SO_4 anhydre. Le poids de ces acides est de 2,85 g.

II) *Estérification*

On pèse 1 g de nitrosométhylurée conservée à + 4°. [On ajoute 5 ml d'une solution de soude à 30%, 40 ml d'éther, conservés également à + 4°.] Au bout de quelques instants la réaction s'amorce, le diazométhane, gaz jaune, passe dans la phase éthérée. Celle-ci est décantée sur pastilles de potasse quand la réaction est terminée. La solution obtenue est, soit utilisée directement, soit après distillation dans un appareil sans rodage.

1) *Méthode au diazométhane*

100 à 200 mg d'acides gras, sont dissous dans 2 à 3 ml d'éther. 10 ml de la solution éthérée de diazométhane fraîchement préparée sont ajoutés. Après 1 à 3 heures de contact à température ambiante on évapore sous vide le diazométhane et l'éther. Le résidu est ensuite repris par de l'éther qu'on évapore également, ceci pour éliminer toute trace de diazométhane qui n'aurait pas réagi.

2) *Méthode de SCHMITZ et METCALFE* (174)

100 à 200 mg d'acides gras sont introduits dans un tube à essai. On ajoute 3 ml de la solution commerciale de mé-

thanol, BF_3 et on porte le tout dans un bain-marie bouillant pendant 2 minutes. Après refroidissement et addition de 30 ml de pentane, on lave avec 20 ml d'eau distillée. La solution d'esters méthyliques est ensuite desséchée sur Na_2SO_4 anhydre.

III) *Chromatographie en phase gazeuse*

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Colonne Phase stationnaire	**Polysuccinate de diéthylèneglycol**	**Gomme de caoutchouc siliconée**
Longueur	200 cm	60 cm
Température	180° — 200° — 210° ou en programmation à 10°/min.	idem
Gaz entraîneur	H_2	H_2
Pression entrée	2 kg/cm²	2 kg/cm²
Sensibilité	1	1
Vitesse de déroulement du papier	2 cm/min.	2 cm/min.
Courant pont	100 mA	100 mA
Température injection	340°	340°
Température sortie	270°	270°

La phase BDS (longueur de la colonne 200cm) a été utilisée dans les mêmes conditions, le support étant la célite.

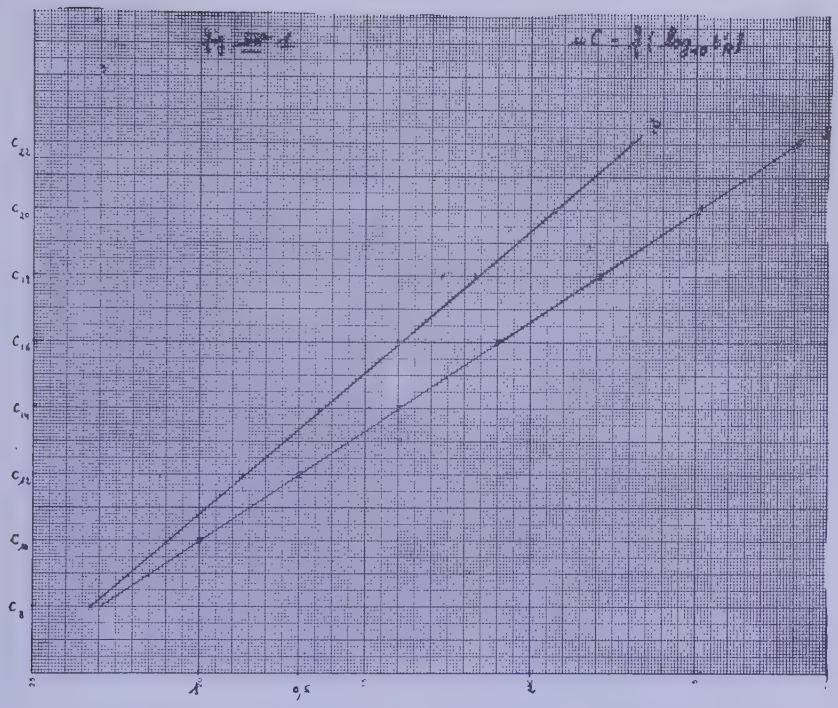
L'intégration des courbes a été réalisée avec un intégrateur à disque fourni avec l'appareil.

En portant sur un graphique le $\log_{10}$ du temps de rétention en fonction du nombre d'atomes de carbone, nous obtenons la figure 1 suivante.

La chromatographie des esters naturels effectuée dans les mêmes conditions permet d'identifier sur ce même graphique les esters saturés en C_{12} C_{14} C_{16} C_{18}.

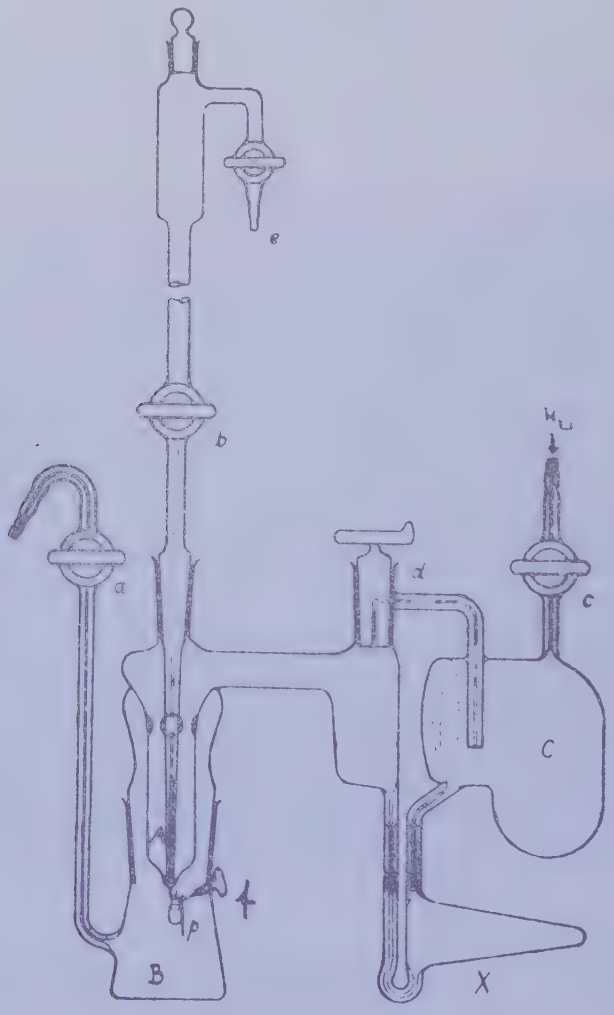
FIGURE 1

$uC = f\ (\log_{10} t'_R)$



IV) *Hydrogénation* (recherche et détermination des doubles liaisons)

L'hydrogénation des esters méthyliques a été réalisée dans un microappareil de CLAUSON-KAAS et LIMBORG dont nous reproduisons le schéma 2 ci-dessous.



A : réservoir à Hg — B : récipient d'hydrogénation — C : réservoir de compensation a, b, c, d, e, robinets — p : panier contenant le produit — f : clef — X : manomètre.

a) *Cas des acides insaturés en C_{16} et C_{18}*

5 –10 mg d'oxyde de platine (catalyseur d'Adams) en suspension dans 2 ml de méthanol sont introduits dans le récipient A. Dans le petit panier accroché à la clef f se trouve le produit à hydrogéner (5—10 mg). Afin d'équilibrer la pression de vapeur du solvant, on introduit la même quantité de solvant dans le récipient C. Le manomètre reliant les deux compartiments est rempli d'alcool méthylique.

Après avoir purgé l'appareil, on le ferme, mais en maintenant ouvert le robinet d. Au bout de 15 minutes le catalyseur a fixé l'hydrogène, on ferme d et on fait basculer dans le récipient A le petit panier contenant le produit. Lorsque le niveau du liquide du manomètre reste constant, on interrompt l'arrivée d'hydrogène et on ramène le liquide des deux branches du manomètre au même niveau à l'aide de la burette contenant du mercure. On détache ensuite le récipient A, on ajoute 5 ml d'éther, on filtre et on rince deux ou plusieurs fois avec 4 ou 5 ml d'éther. Les esters hydrogénés se trouvent dans cette phase éthérée. Ils sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse. Leurs indices de rétention relatifs correspondent respectivement à celui du palmitate et à celui du stéarate de méthyle.

Le volume h (0°,760) d'hydrogène consommé est donné par l'équation :

$$h = \frac{273}{760} (B - e) \frac{a}{T}$$

a volume de Hg utilisé
T Température absolue
B Pression atmosphérique
e pression de vapeur du solvant.

Tout l'appareil est plongé dans un bain thermostaté à 20° ± 0,1°.

b) *Cas de l'ester C_{17} à noyau cyclopropanique.*

Au lieu de procéder à la température de 20° nous avons travaillé à 40° pendant 10 heures et en prenant comme solvant l'acide acétique (KANESHIRO et MARR) (185).

c) *Résultats*

TABLEAU XII

Hydrogénation des esters méthyliques insaturés et à noyau cyclopropanique

Ester	Poids mg	Poids PtO_2 mg	B mm de mercure	T	e mm de mercure	a ml	h ml	h théorique ml
$C_{16}:1$	4,990	5,050	735	293°	96,3	5,32	4,15	4,17
$C_{18}:1$	4,160	5,100	735	293°	96,3	4,00	3,13	3,15
C_{17} : cyclo	8,923	10,524	735	313°	36,4	8,90	7,12	7,06

V) *Oxydation* (localisation de la double liaison)

Afin de localiser la double liaison dans la chaîne normale nous avons essayé deux techniques d'oxydation :

a) Oxydation permanganique/périodique selon LO CHANG TA CHUANG et SWEELEY (179). 20 ml du mélange oxydant contenant 0,09 mole de périodate de sodium et 0,013 mole de permanganate de potassium sont ajoutés à une solution de 5 mg d'ester dans 15 ml de butanol tertiaire et 10 ml de carbonate de sodium 0,1 M. Au bout de 6 heures à température ambiante, la réaction est arrêtée en ajoutant du métabisulfite de sodium jusqu'à décoloration de la solution. On évapore ensuite l'eau et le butanol en présence de potasse. Le résidu est acidifié par de l'acide sulfurique à 15 p. 100 et les acides extraits par l'éther.

b) L'ozonolyse oxydative a été réalisée selon CRIEGEE (180). Un courant d'oxygène ozonisé (débit 600 mg/heure) passe pendant 5 minutes dans 2 ml d'acétate d'éthyle à —70° contenant 10—15 mg d'ester et une quantité équivalente de tétracyanoéthylène. Dès l'apparition de la coloration bleutée, la réaction est arrêtée, l'excès d'ozone chassé par un courant d'azote et les produits d'ozonolyse traités pendant 3 heures à 80° par 50 mg de $AgNO_3$ et 4 ml de NaOH à 10 % selon ASINGER (181).

On extrait les acides par de l'éther et on les transforme ensuite en leurs esters méthyliques pour les analyser par chromatographie.

c) *Oxydation chromique.*

L'oxydation chromique selon CASON et FESSENDEN (65) a été réalisée sur les produits d'hydrogénation de l'ester en C_{17} à cycle propanique. 20—50 mg d'acide chromique sont dissous dans de l'acide acétique glacial (2 ml). Cette solution est ajoutée à 10 mg de produits d'hydrogénation de l'ester en C_{17} à noyau cyclopropanique et chauffée sous reflux pendant une nuit. On extrait ensuite les produits de la réaction par une solution de $NaHCO_3$. Les acides sont ensuite transformés en leurs esters et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

VI) *Inclusion dans l'urée* (recherche d'acides ramifiés)

10—20 mg d'esters sont dissous dans quelques gouttes de pentane ; on ajoute 5 ml de méthanol saturé d'urée, on agite et on laisse reposer pendant une nuit à température ambiante. 5 ml de pentane sont ajoutés aux cristaux qui se sont formés. On filtre ces cristaux et on les lave plusieurs fois avec 5 ml de pentane.

La pentane contient les esters à chaînes ramifiées.

Les esters inclus sont obtenus en détruisant le complexe par de l'HCl à 10%, et en les extrayant ensuite par du pentane.

VII) *Acétylation* (recherche d'acide hydroxylé)

100 mg d'esters sont dissous dans 1 ml de pyridine anhydre. On ajoute 0,9 ml d'anhydride acétique et on laisse au repos pendant 72 h, à température ambiante et à l'obscurité.

Après évaporation sous vide de l'excès d'anhydride et de pyridine, on reprend le résidu par de petites quantités (1 ml) de benzène sec qu'on évapore chaque fois à sec, ceci pour éliminer toutes traces de pyridine et d'anhydride acétique.

Le résidu est dissous dans 10 ml d'éther, lavé deux fois par 5 ml d'HCl N, deux fois par 5 ml d'eau, puis deux fois par 5 ml de Na_2CO_3 N, et finalement par de l'eau.

La phase éthérée est séchée sur Na_2SO_4, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse. (voir page 42)

CHAPITRE III

Les graisses neutres

Cette fraction visqueuse, soluble dans l'acétone, est colorée en jaune. Après isolement et fractionnement, nous avons étudié les différentes fractions et recherché le cholestérol.

I. *Isolement et fractionnement.*

Pour éliminer les phospholipides qui auraient pu être entraînés, les graisses neutres sont chromatographiées sur colonne de silice. Dans ces conditions les phospholipides sont fortement retenus ainsi que les esters de sucres éventuels. Ces produits ne sont élués que par des mélanges de chloroforme et de méthanol. Les graisses neutres sont éluées par des mélanges d'éther de pétrole, de benzène et d'éther.

La première fraction (I) (F.=26°—35°) éluée par le mélange éther de pétrole-benzène a été analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G dans le solvant hexane, éther, acide acétique (90, 10, 1) (v/v). La révélation par des vapeurs d'I_2 ou l'acide sulfurique ou une solution de bleu de bromothymol fait apparaître deux taches. Le Rf de l'une d'elle est le même que celui de la tripalmitine et de la trioléine témoins.

Le spectre I.R. de cette fraction est analogue à celui des triglycérides témoins (absence de bandes OH à 3500 cm^{-1}—3600 cm^{-1}) (189).

Les deux autres fractions (II), visqueuses, éluées respectivement par le benzène et le mélange benzène, éther sont analysées dans les mêmes conditions que la première fraction : ce sont des mélanges d'au moins trois produits de Rf inférieur aux triglycérides témoins.

II. *Résultats de la saponification de la fraction I.*

Pour confirmer la présence de glycérides dans les graisses neutres, nous avons étudié séparément, après avoir saponifié la fraction I avec de la potasse méthanolique, l'insaponifiable (20 % du poids initial), les acides gras (60 %) et l'hydrosoluble (20 %).

1) *Insaponifiable*

Il se présente sous forme visqueuse, sans pouvoir rotatoire apparent. Le spectre infrarouge montre des bandes esters à 1775 cm^{-1}. De l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, il résulte qu'il s'agit des mêmes esters d'acides gras que dans le cas des acides gras libres. La séparation sur colonne de silice donne environ 10% d'esters méthyliques et des fractions contenant un pigment qui n'a pas pu être identifié en raison des trop faibles quantités recueillies.

La recherche de cholestérol est restée négative.

Les esters méthyliques proviennent certainement de l'estérification partielle des acides gras libérés au cours de la saponification en présence de méthanol.

2) *Identification des acides gras*

Après élimination de l'insaponifiable, la phase aqueuse de saponification est acidifiée ; on extrait ensuite les acides gras. Leurs esters méthyliques ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse : ce sont les mêmes que ceux trouvés dans les acides gras libres (tableau XIII).

TABLEAU XIII

Pourcentage des esters méthyliques des acides gras trouvés dans les graisses neutres

Acides en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17}cy.	C_{18}	$C_{18}:1$
	Composition en %						
Sur S	2	25	55	—	10	8	—
Sur P	3	27	42,4	11	9	1,2	5,8

3) *Etude de l'hydrosoluble*

L'hydrosoluble de saponification a été filtré sur résines échangeuses d'ions, Amberlite MB_3, puis analysé par chro-

matographie sur papier et sur plaque, et par chromatographie en phase gazeuse de son acétate.

a) *Chromatographie sur couche mince*

Le tableau XIV résume les résultats obtenus dans trois systèmes de solvants différents, avec comme témoins, du glycérol et du tréhalose.

TABLEAU XIV

Chromatographie sur couche mince de l'hydrosoluble de saponification des graisses neutres

Systèmes de solvants en vol.	Révélateurs	Rf Hydrosoluble	Rf Glycérol	Rf Tréhalose
Butanol 6 Acide acétique 4 Eau 4	1) Phtalate acide d'aniline 2) Périodate, Benzidine 3) Nitrate d'argent ammoniacal	— 0,60 0,60	— 0,60 0,60	— 0,05 0,05
Butanol 9 Eau 1	1) Phtalate acide d'aniline 2) Périodate, Benzidine 3) Nitrate d'argent ammoniacal	— 0,80 0,80	— 0,80 0,80	— 0,15 0,15
Phénol 4 Eau 1	1) Phtalate acide d'aniline 2) Périodate, Benzidine 3) Nitrate d'argent ammoniacal	— 0,50 0,50	— 0,50 0,50	— 0,10 0,10

Le seul constituant de l'hydrosoluble est donc le glycérol, il n'y a pas de sucre.

b) *Chromatographie en phase gazeuse*

Après dessiccation sous vide, le résidu de l'hydrosoluble a été acétylé en présence de pyridine et d'anhydride acétique. Un échantillon de glycérol a été traité de la même façon.

Dans le tableau XV, nous donnons les temps de rétention relatifs (par rapport au pic de l'air) de ces composés après chromatographie en phase gazeuse sur phase P et sur phase S.

TABLEAU XV

Temps de rétention relatifs des acétates de l'hydrosoluble et du glycérol

Temps de rétention	Triacétate de glycérol	Acétate de l'hydrosoluble
sur S	8,3	8,3
sur P	11,4	11,4

L'identité des temps de rétention sur phases S et P des acétates confirme la présence de glycérol dans l'hydrosoluble. Après piégeage nous constatons également que leurs spectres infrarouges sont identiques.

c) *Dosage quantitatif du glycérol*

Le dosage colorimétrique du glycérol selon FAURE (162) avec des solutions de glycérol comme témoin donne environ 15% du glycérol par rapport au poids des graisses neutres (fraction I).

III. *Etude des fractions II*

Ces fractions contiennent également des glycérides : ce sont des mono- et diglycérides (présence de bandes OH sur le spectre I.R.). L'hydrolyse acide de ces fractions donne une partie éthérosoluble contenant le même mélange d'acides gras que la fraction précédente.

Dans la partie hydrosoluble nous avons caractérisé, par chromatographie sur couche mince, du glycérol.

IV. *Recherche de cholestérol*

La présence, dans les lipides des formes L, de cholestérol a été signalée par PARTRIDGE et KLIENEBERGER (190). D'autres auteurs l'ont mentionnée (47) chez des formes L de *Proteus* P_{18}. On admettait alors que le cholestérol était un facteur strictement nécessaire à la croissance de ces microorganismes. Les travaux d'EDWARD(191) ont montré que cette hypothèse n'était pas vérifiée. SMITH et

ROTHBLATT(192), comparant les formes L aux «Pleuropneumonialike Organisms» (PPLO), cultivées en présence de cholestérol montrèrent que, si les premières ont la propriété d'absorber et d'accumuler ce stérol, elles ne peuvent pas le synthétiser.

A la suite de ces travaux, il nous a paru intéressant de vérifier l'absence de cholestérol dans nos fractions.

Nous avons d'abord cultivé des formes L sur milieu contenant 20% de sérum de cheval. Les produits donnant une réaction LIEBERMAN-BURCHARD (193) positive se trouvaient dans la fraction soluble dans l'acétone et plus particulièrement dans les graisses neutres. Nous avons ensuite étudié des cultures qui avaient poussé sur milieu entièrement synthétique, en cherchant le cholestérol dans la même fraction.

Après séparation sur colonne de silice, les fractions sont analysées par chromatographie sur couche mince et par spectroscopie infrarouge. Les spectres infrarouges ne présentent aucune bande caractéristique du cholestérol, ce qui est confirmé par les résultats des chromatographies sur couche mince dans le système pentane, acétate d'éthyle (85/15) (avec comme témoin, du cholestérol, et le trichlorure d'antimoine en solution chloroformique, comme révélateur) (194). De plus, aucune des fractions ne donne de réaction LIEBERMAN-BURCHARD nettement positive.

Nous avons donc conclu que le cholestérol n'entrait pas dans la composition des lipides, ce qui a également été confirmé récemment par MANDEL et coll. (152).

V. *Comparaison avec la forme bactérienne normale*

Dans le cas des formes bactériennes normales, nous trouvons, après purification, des proportions plus importantes (par rapport aux lipides totaux) de graisses neutres (9 % pour 4 % dans le cas des formes L). Leur composition est cependant la même que celle des graisses neutres des formes L : ce sont des mélanges de glycérides complexes contenant tous les acides gras identifiés dans les graisses neutres des formes L.

LES GRAISSES NEUTRES

I. *Isolement et fractionnement*

500 mg de graisses neutres, dissous dans 2 ml d'éther de pétrole (Eb. 40°-60°) sont versés sur une colonne (diamètre 2 cm) contenant 20 g de silice et 10 g de célite. Le volume de chacune des fractions recueillies est de 50 ml. Elles sont ensuite analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice G Merk dans le solvant hexane, éther, acide acétique (90/10/1), avec comme révélateur l'iode, le bleu de bromothymol, l'acide sulfurique, la ninhydrine et le molybdate d'ammonium (tableau XVI).

TABLEAU XVI

Chromatographie des graisses neutres sur colonne de SiO_2

Eluant	Poids des fractions en mg	Comportement sur chromatoplaque	Spectres I.R.
Ether de pétrole	0		
«	0		
Ether de pétrole/Benzène 75/25	0		
«	10	2 taches Rf 0,55 et 0,81	Absence de bandes OH
«	50	révélées par	
«	30	H_2SO_4 et par les	
«	2	vapeurs d'I_2	
Ether de pétrole/Benzène 50/50	11		
«	16	2 taches Rf 0,55 et 0,81	Absence de bandes OH
«	5	révélées par	
		H_2SO_4, I_2	
Ether de pétrole/Benzène 25/75	5		
«	0		
«	2		
Benzène	0		
«	10	3 taches Rf 0,44, 0,30 et 0,15	Présence de bandes OH
«	35	révélées par	
«	10	H_2SO_4, par I_2	
Benzène/Ether 75/25	3		
«	5		

Eluant	Poids des fractions en mg	Comportement sur chromatoplaque		Spectres I.R.
Benzène/Ether 50/50	15	3 taches Rf révélées par H_2SO_4, I_2	0,08	Présence de bandes OH
«	33		0,12	
«	10		0,24	
«	10			
	10			
Benzène/Ether	15			
	30			
Benzène/Ether 25/50	3	«		
«				
«				
Ether	0			
Chloroforme/ Méthanol 5/5	10			
«	60	Produit restant au départ P + N +		Bandes à 1650 cm^{-1}
«	80			
«	10			
«	0			
«	0			

II. *Recherche du cholestérol*

Fractionnement sur colonne de silice

200 mg de graisses neutres sont séparés sur une colonne contenant 18 g de silice Mallinckrodt. Les fractions recueillies sont de 10 ml.

Le tableau XVII rend compte des résultats.

a) Réaction de LIEBERMAN-BURCHARD.

On ajoute à 1 ml d'une solution chloroformique contenant 0,2 à 0,5 mg de lipides, 5 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Le mélange est placé pendant 30 minutes à l'obscurité. L'intensité de la coloration est mesurée à 650 mμ.

b) Les chromatographies sur couche mince de silice ont été réalisées avec de la silice Mallinckrodt selon BARBIER, JAEGER et TOBIAS (153). Le solvant utilisé est un mélange de pentane et d'acétate d'éthyle (85/15). La révélation se fait avec une solution chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine. Le cholestérol se colore en rouge violet.

TABLEAU XVII

Chromatographie des graisses neutres sur colonne de silice

Eluant	Poids des fractions en mg	Coloration de la réaction de L.-B.	Révélation des plaques par $SbCl_3$
Ether de pétrole	0,0		
«	0,0		
«	0,0		
E. de P./Benzène 1/1	20,0	négative (jaune)	négative
« «	0,0		
« «	0,0		
« «	0,0		
E. de P./Benzène 3/7	0,0		
« «	0,0		
« «	4,0	négative (jaune)	négative
Benzène	10,0	négative	«
«	10,0	« jaune	«
«	10,0	« rouge	«
«	10,0	«	«
«	0		
«	0		
Benzène/Ether 95/5	0,0		«
« «	15,0	légèrem. verte	«
« «	20,0	«	
« «	0,0		
« «	0,0		
« «	0,0		
« 90/10	3,4	«	
« «	0		
« «	0		
« «	0		
« 80/20	0		
« «	0		
« «	0		
« 60/40	0		
« «	0		
« «	2		«
« «	0		
« 30/70	10	rouge	«
« «	2		
	0		

Eluant	Poids des fractions en mg	Coloration de la réaction de L.-B.	Révélation des plaques par $SbCl_3$
Ether	0		
«	0		
«	0		
Ether/Méthanol 97/3	0		négative
«	2	rouge	
«	0		
Ether/Acide acétique 99,5/0,5	59	rouge	«
«	5	«	«
«	1		
« 99/1	1	«	«
«	0		
«	0		

L-B réaction de Lieberman-Burchard

III. *Saponification*

Les graisses neutres (100 mg) sont dissoutes dans un minimum de benzène et chauffées à reflux avec 1 ml de potasse méthanolique à 10 % pendant 3 heures. La préparation de la potasse méthanolique se fait en dissolvant la potasse dans le minimum d'eau et en ajoutant du méthanol purifié par la méthode au méthylate de magnésium.

Après saponification, l'insaponifiable soluble dans l'éther est séparé de la phase aqueuse contenant les sels de potassium des acides gras et l'hydrosoluble de saponification. Son poids est de 20 mg.

La phase aqueuse est acidifiée par HCl à 10 % jusqu'à pH = 1 et les acides gras extraits à l'éther. Ces acides gras ont été étudiés avec les mêmes techniques que les acides gras libres. Leur poids est de 60 mg.

Après évaporation d'HCl, la phase aqueuse est déionisée sur Permutite 50 ou Amberlite MB_3. La chromatographie est effectuée sur papier Whatman 1 ou 4, sur couches de cellulose Pleuger ou de silice Mallinckrodt. Les solvants

utilisés sont soit le système butanol, acide acétique, eau (6/4/4 en volume), soit butanol, eau (9/1), soit le phénol, eau (4/1). Les révélateurs : le phtalate acide d'aniline pour les sucres, et le système périodate, benzidine pour les polyols ; le glycérol et le tréhalose sont utilisés comme témoins (voir tableau XIV page 56).

IV. *Hydrolyse acide*

100 à 200 mg de graisses neutres sont dissous dans le minimum de méthanol et chauffés avec 2 ml d'HCl N pendant 3 heures à reflux. On sépare l'étherosoluble (les acides gras et l'insaponifiable) de l'hydrosoluble contenant le glycérol et les oses éventuels. On filtre la phase aqueuse sur Amberlite MB$_3$. La chromatographie est réalisée avec, comme témoins, le glycérol et des oses tels que le glucose, le tréhalose, et le rhamnose. Seul le glycérol a été décelé.

V. *Dosage colorimétrique du glycérol*

La phase aqueuse de saponification, déionisée préalablement sur amberlite MB$_3$ a été concentrée à 5 ml. On prélève 0,05 ml de cette solution qui servira au dosage du glycérol, avec comme témoins des solutions de glycérol de 0,020 mg à 0,500 mg/ml. On trouve ainsi pour 0,05 ml de la phase aqueuse 0,150 mg de glycérol, soit 15 mg de glycérol pour 100 mg de graisses neutres.

CHAPITRE IV

Phospholipides et cires A

Ces deux fractions contiennent du phosphore et de l'azote, leurs spectres infrarouges sont très analogues et les résultats de leurs analyses par chromatographie sur couche mince également.

La nature très polaire des phospholipides leur confère des propriétés particulières, telles que la formation d'émulsion dans l'eau, l'entraînement d'autres lipides ne contenant pas de phosphore (lipopeptides) (140 à 142, 195) ou même de peptides. Il est donc nécessaire d'effectuer des purifications répétées avant d'entreprendre leur étude.

Ces purifications ont été réalisées selon la méthode de FOLCH (196) puis complètées par filtration sur poudre de cellulose (197). L'opération est renouvelée jusqu'à ce que les dosages d'azote et de phosphore des fractions purifiées soient constants.

I. *Isolement et propriétés*

Les résultats de la séparation sur couche mince de gel de silice des phospholipides et des cires A, après purification, sont consignés dans le tableau XVIII.

Ainsi, après purification, les deux fractions contiennent des produits qui ont le même Rf et sont révélés par les mêmes réactifs.

Par chromatographie sur couche mince, nous notons cependant l'apparition dans le cas des cires A, de deux types de taches ; les unes révélables avec les réactifs : ninhydrine et molybdate d'ammonium. Les autres, inertes à ces mêmes réactifs, mais révélées par les vapeurs d'iode ou par l'acide sulfurique.

TABLEAU XVIII

Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince des phospholipides et des Cires A

Systèmes de solvants en vol.	PHOSPHOLIPIDES			CIRES A		
	Rf	Révélation Molybd.	Ninhyd.	Rf	Révélation Molybd.	Ninhyd.
SYSTEME I						
Chloroforme 60	0,90	+	—	0,90	+	—
Méthanol 40	0,70	+	+	0,70	+	+
Pyridine 2	0,35	+	+	0,35	+	+
Eau 2	0,08	brune foncée		0,50 0,40 0,30	révélées par H_2SO_4	
SYSTEME II						
Chloroforme 80	0,80	+	—	0,80	+	—
Méthanol 20	0,37	+	+	0,37	+	+
	0,12	+	+	0,12	+	+
	0,00	brune foncée		taches révélées par H_2SO_4		
SYSTEME III						
Chloroforme 65	0,94	+	—	0,94	+	—
Méthanol 25	0,73	+	+	0,73	+	+
Acide acétique 8	taches allongées			taches allongées		
Eau 4						

(+) présence de taches
(—) absence de taches

Il existe également d'autres différences entre les phospholipides et les cires A, comme le montrent les résultats du tableau XIX.

Après saponification ou hydrolyse acide des phospholipides d'une part, des cires A d'autre part, l'étude par chromatographie sur couche mince des fractions hydrosolubles montre que ces deux fractions ne contiennent que du glycérol, de l'éthanolamine et de la sérine.

TABLEAU XIX

Données analytiques des deux fractions après purification

	PHOSPHOLIPIDES	CIRES A
Fusion	142°—152°	105°—110°
Teneur en Phosphore	2,76%	2,52%
Teneur en Azote	2,2 %	2,0 %

TABLEAU XX

Résultats de la saponification des phospholipides et des cires A

	PHOSPHOLIPIDES		CIRES A	
Insaponifiable	1,5% — 2,5%		2% — 3%	
Fraction éthérosoluble Acides gras	65 %	C_{12} 2 % C_{14} 12,6% C_{16} 46,8% $C_{16}:1$ 13,4% C_{17} cycl. 14,8% C_{18} 0,7% $C_{18}:1$ 7,3%	50 %	C_{12} 0,5% C_{14} 6,5% C_{16} 52,8% $C_{16}:1$ 14,6% C_{17} cycl. 13,3% C_{18} 1,7% $C_{18}:1$ 8,5%
Fraction hydrosoluble	30 %	Azote 5 % Phosphore 4 % Glycérol 40 % Acides am. (éthanolam. sérine) 40 %	45 %	Azote 4 % Phosphore 3,5% Glycérol 30 % Acides am. (éthanolam. sérine) 22 %

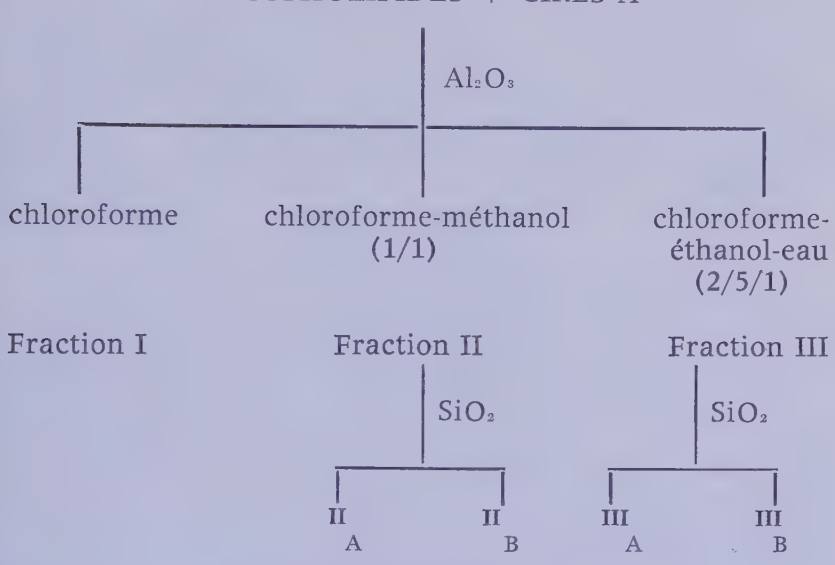
Les légères variations des pourcentages des constituants sont certainement à l'origine des différences trouvées dans les données analytiques préalables.

Nous en avons conclu qu'en plus de phospholipides, les cires A contiennent des glycérides. Le fractionnement sur colonne de silice a permis de les isoler et de les identifier.

II. *Fractionnement*

Nous avons réuni les phospholipides et les cires A. En raison des résultats obtenus par chromatographie sur couche mince, nous avons essayé de séparer ces composés sur colonne d'alumine(198) puis sur colonne de silice(199).

Le schéma suivant indique la voie poursuivie :



1) *Séparation sur alumine*

a) la fraction I, éluée par le chloroforme, est constituée par des glycérides (chromatographie sur couche mince, spectre infrarouge, absence d'azote et de phosphore, identification de glycérol après hydrolyse). Ces glycérides représentent 14% du mélange de phospholipides et de cires A de départ.

b) la fraction II (F = 182°; P 3,2% ; N_2 0,2%) éluée par le mélange chloroforme, méthanol (1/1) est enrichie en produit dont le Rf sur couche mince est le plus élevé. (Rf=0,90, système I) (voir page 65). Il s'agit, comme nous le verrons plus loin, d'un sel de Mg d'un acide phosphatidique.

c) la fraction III (F = 205°—210°; P 2%, N_2 2,7%), éluée par le mélange chloroforme, éthanol, eau (2/5/1) est par

contre enrichie en produits contenant du phosphore et de l'azote et dont les Rf (dans le système I) (voir page 65) sont de 0,70 et 0,35. Cette fraction contient des phosphatides à éthanolamine et à sérine.

Aucune de ces fractions n'est pure (contrôle par chromatographie sur couche mince).

2) *Séparation sur silice des fractions II et III*

Pour purifier davantage les fractions II et III, nous les avons fractionnées sur colonnes de silice. Dans le tableau XXI nous avons réuni les résultats obtenus après analyses par chromatographie sur couche mince des différentes fractions.

TABLEAU XXI

Résultats de la séparation sur colonne de silice des fractions II et III

Fractions	Eluées par	P	N	Rf sur couche mince de silice dans le système II (voir page 65)
II A	chloroforme/ méthanol 8/2	+	—	0,80
II B	chloroforme/ méthanol 7/3	+	+	0,37 0,12
	et 5/5	+	+	
III A	chloroforme/ méthanol 8/2	+	—	0,80
III B	chloroforme/ méthanol 7/3	+	+	0,37 0,12
	et 5/5	+	+	

(—) quantités faibles

A la suite de ces résultats nous avons réuni les fractions II_A et III_A ainsi que les fractions II_B et III_B.

III. *Etude de la fraction* (II_A—III_A): *Identification d'un sel de magnésium d'un acide phosphatidique.*

Les impuretés de cette fraction sont très faibles et n'ont pas gêné l'identification.

Cette fraction (F = 161°—163°) contient 4,3 % de phosphore, 12,5 % de glycérol, pas d'azote ni de sucres. Elle donne une proportion relativement élevée de cendres (14 %). En la traitant par HCl, on obtient une substance acide soluble dans l'éther (F = 48°—50°).

Dans la partie aqueuse l'ion magnésium a été décelé.

Le spectre infragrouge de l'acide, que nous avons isolé, présente des bandes à 3500 cm^{-1} (OH libres). La bande ester à 1775 cm^{-1} est très intense ainsi que la bande à 1050 cm^{-1} (P-O-C).

Son pouvoir rotatoire n'est pas mesurable.

Le produit de cette fraction présente une grande analogie avec le sel de magnésium d'un acide phosphatidique, isolé par VILKAS(24), à partir d'une souche de Mycobactérie (H_{37} Rv streptomycino-résistante).

Afin de le contrôler nous avons hydrolysé cette fraction II_A, III_A.

1. *Identification des acides gras*

L'hydrolyse alcaline ménagée donne un mélange d'acides gras (60—65% du poids initial) contenant de l'acide myristique (14%) et de l'acide palmitique (78%) à côté de quantités plus faibles (8 %) des autres acides trouvés dans les graisses neutres et les acides gras libres et qui proviennent, sans doute, de l'hydrolyse des impuretés. Ces acides ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse sous forme d'esters méthyliques. Nous remarquons que dans le cas du sel de magnésium, isolé par VILKAS, il s'agissait d'acides palmitique et stéarique.

2. *Identification de l'hydrosoluble.*

Après saponification, l'hydrosoluble (40 % du poids initial) a été analysé par chromatographie sur papier. La révélation par le réactif molybdique donne, dans les deux systèmes de solvants [acétone, méthanol, acide trichloracétique (65/25/30) et méthanol, acide formique, eau (80/15/5)] une tache de Rf respectivement 0,82 et 0,55 correspondant d'après VILKAS à l'acide α-glycérophosphorique (24).

L'hydrolyse acide par HCl N libère uniquement du glycérol, décelé par chromatographie sur plaque avec du glycérol comme témoin.

L'ion magnésium a été retrouvé dans cette partie hydrosoluble.

IV. *Etude de la fraction* (II_B, III_B):

Identification de phospholipides contenant de l'éthanolamine et de la sérine.

Cette fraction donne, par chromatographie sur couche mince, quatre taches : la première correspond au sel de magnésium de l'acide phosphatidique. Elle n'est pas révélée par la ninhydrine. Il en est de même pour la tache restant au point de départ. Les deux autres taches, par contre, se révèlent fortement par la ninhydrine et par le molybdate d'ammonium (tableau XXI, page 68).

Cette même fraction (F = 205°—210°) contient 1,60 % d'azote, 1,85 % de phosphore, 6 % de glycérol, 6 % d'acides aminés. Sa teneur en cendres est de 4 %.

Le spectre infrarouge présente des bandes à 3300 cm^{-1}, 1563 cm^{-1} et 1639 cm^{-1} (-CO-NH-) et des bandes entre 1053 —1110 cm^{-1} qui pourraient être des bandes alcool.

La mesure du pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = +2°$. ($CHCl_3$; C=1)

Nous avons soumis cette fraction à l'hydrolyse alcaline.

1) *Identification des acides gras*

L'hydrolyse alcaline ménagée libère un mélange d'acides gras correspondant à 59% du poids du phospholipide.

Ce mélange comprend, à la différence de la fraction II_A, III_A, tous les acides gras trouvés dans les autres fractions. Le tableau XXII en donne la répartition.

TABLEAU XXII

Pourcentage des esters méthyliques des acides gras de la fraction (II_B, III_B) *des phospholipides*

Esters méthyliques d'acides en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17}cycl.	C_{18}	$C_{18}:1$
%	1,5	10,9	50,8	10,6	16,4	1,7	7,9

2) *Composition de l'hydrosoluble*

a) L'hydrolyse par HCl N de l'hydrosoluble de saponification donne par chromatographie sur papier Whatman dans le système isopropanol, acide acétique, eau (6/3/1) une tache de Rf correspondant à celui du glycérol (Rf=0,83) [mis en évidence également dans le système butanol, eau (9/1).]

b) L'hydrolyse par HCl 6N pendant 3 heures permet de déceler par chromatographie dans trois systèmes de solvants différents (voir partie expérimentale page 73) l'éthanolamine et la sérine (en quantité beaucoup plus faible pour cette dernière).

Nous les avons également identifiées par leurs dérivés dinitrophénylés : F=89° (th. 90°) pour le dérivé de l'éthanolamine et F=200° (th. 199°) pour celui de la sérine.

V. *Comparaison avec les phospholipides de la forme bactérienne normale*

Ramenée au poids sec des bactéries, la teneur en phospholipides est trois fois plus importante chez les formes L mais, ramenées aux poids des lipides totaux, les proportions sont tout à fait semblables (de l'ordre de 70%).

La chromatographie sur couche mince montre qu'il s'agit d'un mélange de composés ayant même Rf. L'hy-

drolyse des phospholipides de P18 libère les mêmes acides gras que ceux trouvés dans les phospholipides des F.L., ainsi que de l'éthanolamine et de la sérine.

Dans le cas des formes bactériennes normales, nous pouvons disposer de quantités plus importantes de matière première, ce qui permet de poursuivre le fractionnement dans le but de séparer les phospholipides contenant l'éthanolamine, de ceux contenant de la sérine, et de voir si l'amino-alcool et l'acide aminé font partie de la même molécule de phosphatide. Les quantités extrêmement faibles auxquelles nous avons abouti, après fractionnement, ne nous ont pas permis de résoudre cette question.

Nos résultats diffèrent cependant de ceux de MANDEL et coll. (200) qui ont mis en évidence de l'acide polyglycérophosphatidique alors que nous avons identifié le sel de magnésium d'un acide phosphatidique.

PHOSPHOLIPIDES ET CIRES A

I. *Extraction et purification*

1) *Les phospholipides* sont extraits comme indiqué précédemment (chapitre I, page 31). Ils sont ensuite lavés selon FOLCH (196).

— 900 mg de phospholipides, dissous dans 12 ml de chloroforme et 6 ml de méthanol, sont introduits dans un bécher de 20 ml qui est ensuite immergé dans un second de 250 ml, rempli d'eau distillée.

Après 24 heures de contact. (la solution chloroformique est agitée de temps en temps) le méthanol a diffusé en grande partie dans l'eau. Il reste au fond du petit bécher la solution chloroformique. La phase aqueuse est décantée à l'aide d'une pipette et on recueille la phase chloroformique, qui est desséchée sur Na_2SO_4, puis évaporée à sec. Le poids est de 800 mg.

Afin de voir si la diminution du poids des phospholipides (100 mg) est due aux impuretés entraînées, nous avons agité deux fois la phase aqueuse avec 50 ml d'éther.

La phase éthérée est desséchée sur Na_2SO_4, puis évaporée à sec. Le poids du produit solubilisé dans l'éther est de 2 mg. Nous en avons conclu que les 98 mg manquants étaient des impuretés solubles dans l'eau et non des phospholipides.

Ces derniers sont ensuite repris par 20 ml de chloroforme et filtrés sur une colonne (diamètre 2,5 cm) de 25 g de cellulose (197).

On lave la colonne avec 2 l de chloroforme. Celui-ci, après évaporation, laisse 800 mg de résidu. L'analyse des phospholipides a été effectuée par chromatographie sur couche mince (tableau XVIII, page 65) et leurs propriétés analytiques déterminées (tableau XIX, page 66).

2) *Les cires A* sont traitées de la même manière et en prenant les mêmes quantités (900 mg). Il y a cependant moins d'impuretés ; on recueille après lavage et filtration sur cellulose 880 mg.

L'analyse par chromatographie sur couche mince des cires A donne les mêmes résultats que pour les phospholipides (tableau XVIII). Leurs propriétés analytiques sont cependant légèrement différentes. (tableau XIX).

II. *Identification des acides gras*

1) *Phospholipides*

200 mg de phospholipides sont dissous dans 5 ml de benzène, 2 ml d'une solution de potasse éthanolique à 15% sont ajoutés. Après 6 heures de saponification à reflux, on concentre sous vide, on ajoute 5 ml d'eau et on extrait plusieurs fois par 5 ml d'éther. L'insaponifiable pèse (après avoir séché la solution sur Na_2SO_4 et évaporé l'éther) 4 mg.

La phase aqueuse est ensuite acidifiée jusqu'à pH=1 par HCl à 10% et lavée par l'éther (2 à 3 fois par 5 ml). Le poids des acides gras ainsi extraits est de 130 mg. Analysés par chromatographie en phase gazeuse, leurs esters donnent les mêmes pics que les acides identifiés dans les «graisses neutres» et dans les «acides gras libres». Leurs pourcentages sont indiqués dans le tableau XX (page 66).

2. *Cires A*

La même quantité de cires A, traitée de la même façon, donne 5 mg d'insaponifiable et 100 mg d'acides gras, dont la composition est donnée dans le tableau XX.

III. *Hydrolyse acide : analyse de la fraction hydrosoluble*

1. *Phospholipides*

5 ml de la phase aqueuse provenant de la saponification sont chauffés avec 5 ml d'HCl à 10% sous reflux pendant 3 heures. La solution est ensuite déionisée sur Amberlite MB_3, puis concentrée à 5ml. Les chromatographies sur couche mince de cellulose de cette fraction révèlent la présence de glycérol, d'éthanolamine et de sérine.

a) *Dosage du glycérol*

0,8 ml de la phase aqueuse déionisée sont évaporés à sec sous vide, en présence de KOH, à la température ambiante. Le résidu, après évaporation de l'eau, est de 1,2 mg.

Ces 1,2 mg sont repris par de l'eau. Cette solution sert au dosage du glycérol selon FAURE (162). Nous trouvons

ainsi 0,48 mg de glycérol, soit 40% par rapport au poids sec de la phase aqueuse.

b) *Dosage des acides aminés*

1 ml de la phase aqueuse de saponification et 1 ml d'HCl concentré sont chauffés pendant 6 heures à reflux. Après évaporations répétées sous vide pour chasser HCl et filtration de manière à éliminer la partie «humique», on concentre à 1 ml. Le dosage des acides aminés sur 0,5 ml avec une courbe témoin établie avec de l'éthanolamine et de la sérine en parties égales, donne 0,6 mg soit 40% du poids sec de la phase aqueuse.

2. *Cires A*

Les résultats obtenus dans ce cas sont légèrement différents. La phase aqueuse de saponification des cires A contient 4% d'azote, 3,5% de phosphore et 30% de glycérol ainsi que 20% d'acides aminés.

3. *Recherche d'inositol*

2 ml de la solution aqueuse de saponification sont hydrolysés par 2 ml d'HCl 4 N pendant 12 heures à 110° en ampoule scellée. On élimine ensuite HCl et la phase aqueuse est analysée par chromatographie sur papier Whatman 1, dans le solvant isopropanol, acide acétique, eau (6/3/1 en volume). La recherche d'oses et d'inositol est négative.

IV. *Fractionnement des phospholipides et des cires A*

En raison des résultats précédents, nous avons réuni phospholipides et cires pour les fractionner ensuite sur colonne, afin de séparer les produits donnant par chromatoplaques des taches différentes.

a) *Sur alumine* (tableau XXIII)

200 mg sont dissous dans 2 ml de chloroforme et la solution versée sur une colonne (diamètre 1,5 cm) de 10 g d'alumine Merck (activité II). Les fractions de solvant recueillies sont de 10 ml.

En raison des résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince et de leur ordre d'élution, nous avons réuni les fractions 7 à 10 (II) ainsi que les fractions 12 à 15 (III). Leurs propriétés sont indiquées dans le tableau XXIII.

Ces fractions sont encore des mélanges et nous avons essayé de les purifier davantage sur colonne de silice.

TABLEAU XXIII

Fractionnement des phospholipides et des cires A sur colonne d'alumine

Fractions		Solvant	Poids des fractions en mg	Fusion	Dosages		Analyse par chromatographie sur couche mince
					N_2	P	
I	1	Chloroforme	0	Fus. pâteuse	—	—	identique aux graisses neutres
	2		5				
	3		15				
	4		7				
	5		0				
	6		0				
II	7	Chloroforme/ Méthanol 1/1	30				plusieurs taches, la plus importante a le Rf le plus grand
	8	« «	40				
	9	« «	17	182°-183°	0,2%	3,2%	
	10	« «	2				
	11	« «	0				
III	12	Ethanol/ Chloroforme/ Eau 5/2/1	1				Deux taches centrales, les plus importantes. Une tache ne migrant pas
	13	« «	3	205°-210°	2,7%	2 %	
	14	« «	47				
	15	« «	30				
	16	« «	0				

b) *Chromatographie sur silice*

Fraction II (tableau XXIV): 89 mg sont séparés sur 5 g de silice et 2,5 g de célite.

Les fractions recueillies sont de 10 ml chacune.

TABLEAU XXIV

Résultats de la séparation sur colonne de silice de la fraction II

Fractions		Eluant			Poids en mg	Fusion	P %	N_2 %	Analyse par chromatographie sur couche mince
	1	Chloroforme			0				
	2	«			0				
	3	Chloroforme/méthanol		9/1	0				
	4	«	«	«	0				
	5	«	«	8/2	15				1 tache importante à Rf élevé, traces des 3 autres taches
II_A	6	«	«	«	33,1				
II_A	7	«	«	«	10,0	161°—163°	4,3	0	
II_A	8	«	«	«	5,0				
	9	«	«	7/3	3,4				4 taches: les deux du milieu sont les plus importantes
II_B	10	«	«	«	6,3	205°—210°	2,0	1,5	
II_B	11	«	«	«	1,7				
II_B	12	«	«	«	0				
	13	«	«	5/5	3,6				Tache ne migrant pas, difficile à révéler
	14	«	«	«	0				
	15	«	«	«	0				
	16	Méthanol			0				
	17	«			7,5				
	18	«			0				

Fraction III (tableau XXV): 77 mg, 4 g de silice, 2 g de celite. Les fractions recueillies sont de 10 ml chacune.

TABLEAU XXV

Séparation sur colonne de silice de la fraction III

Fractions	Eluant	Poids en mg	Fusion	P %	N_2 %	Analyse par chromatographie sur couche mince
1	Chloroforme	0				
2	«	0				
3	Chloroforme/méthanol	0				
III A 4	« « 9/1	11	162°—163°	4,0	0	1 tache faible
III A 5	« « 8/2	7				
6	« « «	0				
III B 7	« « 7/3	9				4 taches. Les deux du milieu sont les plus importantes
III B 8	« « «	21	205°—210°	1,9	1,7	
III B 9	« « «	9,2				
10	« « 5/5	8,0				Les mêmes taches que précédemment, en plus une tache ne migrant pas et difficile à révéler
11	« « «	2,1				
12	Méthanol	3,6				
13	«	3,5				

En raison des résultats de la chromatographie sur couche mince, les fractions suivantes ont été réunies.

5 à 8 (II_A) et 9 à 12 (II_B) ainsi que

4 à 5 (III_A) et 7 à 9 (III_B)

Nous constatons que les pourcentages en azote et en phosphore, les points de fusion, l'analyse par chromatographie sur couche mince donnent des résultats très voisins pour II_A et III_A (tableaux XXIV et XXV) d'une part, et II_B et III_B d'autre part. Nous avons donc réuni les parties semblables et obtenons ainsi 70 mg de (II_A, III_A) et 80 mg de (II_B, III_B).

V. *Etude de la Fraction* (II_A, III_A)

Identification du sel de magnésium d'un acide phosphatidique

Le point de fusion de cette fraction, la teneur en phosphore, l'absence d'azote ainsi que le comportement sur couche mince de gel de silice, nous ont fait penser qu'il s'agissait d'un sel d'un acide phosphatidique, analogue à celui isolé par VILKAS.

Elle contient 60 % d'acides gras, 12,5 % de glycérol, 4,3 % de phosphore, soit 13 % d'acide phosphorique.

1°) *Recherche de l'ion magnésium*

10 mg de (II_A, III_A), dissous dans 1 ml d'éther, sont lavés par trois fois avec 1 ml d'HCl N. La phase acide est évaporée à sec et reprise par de l'eau. L'ion Mg^{++} est décelé par formation du phosphate ammoniaco-magnésien ($Mg\,NH_4PO_4$) contrôlé au microscope.

2° *Recherche de l'acide phosphatidique*

L'éther est évaporé. Le point de fusion du résidu est de 48° à 50° (48° à 51°).

a) *Acides gras*

50 mg (II_A, III_A) sont dissous dans 2 ml de benzène. 0,2 ml de potasse éthanolique à 15 % sont ajoutés. Après 24 heures d'hydrolyse à température ambiante et concentration sous vide, on reprend par de l'eau et de l'éther. La partie insaponifiable est extraite par l'éther : son poids est de 5 mg. La phase aqueuse est acidifiée à pH = 1 par HCl N.

Les acides gras libérés sont extraits par de l'éther. Leur poids est de 32,5 mg, soit environ 64 %.

L'étude des esters méthyliques de ces acides gras par chromatographie en phase gazeuse montre deux grands pics correspondant l'un au myristate de méthyle (14 %), l'autre au palmitate de méthyle (78 %). Les autres pics sont nettement plus petits et correspondent aux autres esters identifiés dans les graisses neutres.

b) *Etude de l'hydrosoluble*

Après élimination de l'insaponifiable, et après extraction des acides gras, la phase aqueuse a été filtrée sur Amberlite MB_3. La chromatographie sur papier Whatman No 1 et No 4 révélée par le réactif à la ninhydrine puis par le molybdate d'ammonium a été réalisée dans les conditions suivantes : (tableau XXVI).

TABLEAU XXVI

Etude par chromatographie sur papier de la phase aqueuse de saponification de la fraction II_A *et* III_A

Papier	Systèmes de solvants en vol.		Temps de migration	Ninhydrine	Molybdate Rf
Whatman N° 1 ascendante	Acétone	65	4 h 30 min	—	0,82
	Méthanol	25			
	Ac. trichloracétique à 20%	30			
Whatman N° 4 ascendante	Méthanol	80	6 heures	—	0,55
	Ac. formique	15			
	Eau	5			

Le Rf de cette substance dans les deux solvants est le même que celui trouvé par VILKAS (24) pour l'acide α-glycérophosphorique.

L'hydrolyse de la phase aqueuse par 2 ml d'HCl N pendant 1 heure libère du glycérol décelé par chromatographie sur couche mince, comme dans le cas des graisses neutres. Le dosage a été réalisé de la même manière que dans le cas de ces dernières.

VI. *Etude de la fraction* (II_B, III_B)
Identification d'un phospholipide contenant de l'éthanolamine et de la sérine

Les propriétés de cette fraction (tableaux XXIV (page 77) et XXV (page 78), montrent qu'il s'agit encore d'un mélange d'au moins deux produits contenant de l'azote. Cette fraction contient 59% d'acides gras. Dans la phase hydrosoluble résultant de l'hydrolyse acide, nous avons dosé 6% de glycérol, 6% d'acides aminés et 4% de cendres. Le pouvoir rotatoire est de + 2° (C=1).

1. *Identification des acides gras*

60 mg (II_B, III_B) sont dissous dans 2 ml de benzène. On ajoute 0,2 ml de potasse éthanolique à 15%. Après 24 heures d'hydrolyse à température ambiante, puis concentration sous vide, on reprend par 2 ml d'eau et 2 ml d'éther. La phase éthérée est desséchée sur Na_2SO_4 puis l'éther est évaporé. Elle contient 5 mg d'insaponifiable.

La phase aqueuse de saponification est acidifiée à pH=1 par HCl à 10% puis est extraite par l'éther. Cette phase éthérée contenant les acides gras est desséchée sur Na_2SO_4, puis évaporée à sec. Elle pèse 35,4 mg. Les esters méthyliques analysés par chromatographie en phase gazeuse ont la composition donnée dans le tableau XXII (page 71).

2. *Etude de la phase hydrosoluble de saponification : recherche de glycérol, d'éthanolamine et de sérine.*

La phase aqueuse de saponification est ensuite hydrolysée par HCl N (2 ml) pendant 1 heure. Après élimination de HCl, la chromatographie sur couche mince de cellulose dans le système : isopropanol, acide acétique, eau (6/3/1) révélée par le système périodate, benzidine, donne une tache (Rf=0,83) identique à celle du glycérol témoin. Dans le système butanol, eau (9/1) le Rf est de 0,80.

L'éthanolamine et la sérine ont été identifiées dans la même phase aqueuse (hydrolysée par 2 ml d'HCl 6 N pendant 3 heures) dans les conditions mentionnées dans le tableau suivant :

TABLEAU XXVII

Etude par chromatographie sur couche mince de l'hydrolysat acide de la fraction II^B, III^B

Système de solvants en vol.	Rf de l'éthanolamine	Rf de la sérine	Rf de l'hydrolysat
Phénol 50 m-crésol 50 saturé d'eau	0,79	0,69	0,79—0,69
Butanol 60 Acide acétique 20 Eau 20	0,36	0,21	0,36—0,21
n Propanol 64 Eau 36	0,74	0,38	0,74—0,38

3°) *Dérivés dinitrophénylés*

400 mg de phospholipides sont hydrolysés par 20 ml d'HCl 6 N pendant 3 heures. Après évaporation de HCl et extraction des acides gras par l'éther, la phase aqueuse est évaporée à sec, le résidu est repris par 5 ml de tampon acétate 0,2 M (pH=5,0), puis filtré sur résine Dowex 50 (x8), 100—200 mesh, on lave par 50 ml du même tampon qui entraîne la sérine, alors que l'éthanolamine est éluée par une solution d'acétate de sodium à 10 % (pH=8).

0,2 ml de fluoro-1-dinitro-2,4-benzène sont ajoutés à chacune des solutions précédentes après les avoir concentrées à 5 ml et ajustées à pH=9 (Na 0H).

On agite pendant 60 minutes. Le dérivé de l'éthanolamine est ensuite extrait par du chloroforme de la phase aqueuse acidifiée et, dans le cas de la sérine, par la méthylisobutylcétone. On recristallise dans le méthanol.

TABLEAU XXVIII

Points de fusion

Dérivé	de l'éthanolamine	de la sérine
trouvé	89°	200°
théorique	90°	199°

CHAPITRE V

Cires chloroformiques et lipides liés

Dans un premier travail sur la composition des lipides de la forme L, nous avions trouvé, en utilisant pour l'extraction et le fractionnement la technique d'ANDERSON, des «cires chloroformiques» en proportion à peu près équivalente à celle trouvée dans les Mycobactéries. La séparation par chromatographie sur colonne de SiO_2 n'a donné que des fractions qui se composent de quantités importantes de lipides contenant du phosphore et de l'azote.

Dans une première partie, nous avons étudié les cires chloroformiques «brutes» puis les «cires B, C, D» obtenues par la méthode d'ANDERSON. Enfin, une troisième partie est consacrée aux lipides liés.

I. — *ETUDE DES CIRES CHLOROFORMIQUES BRUTES*

Après extraction par le chloroforme, les cires sont lavées avec de l'eau, puis filtrées sur cellulose (cf. chapitre I).

Leur fusion varie de 157° à 175°; $[\alpha]_D^{CHCl_3} = +2°.6$.
Elles contiennent 2 % d'azote et 3 % de phosphore. Le spectre infrarouge de ces cires présente des bandes très larges à 1650 cm^{-1}, à 1250 cm^{-1} et autour de 1100 cm^{-1} attribuables aux groupements CONH et C-O. Par chromatographie sur couche mince de silice dans le système I (chloroforme, méthanol, pyridine, eau) elles donnent trois taches révélables par la ninhydrine et le molybdate d'ammonium (Rf 0,70, 0,35, O,00) et trois autres taches révélées par des vapeurs d'iode ou par l'acide sulfurique (Rf 0,97, 0,90 et O,11).

1°) - *Identification des acides gras*

Après hydrolyse acide de 51 mg de cires nous avons identifié par chromatographie en phase gazeuse des acides gras dont nous donnons la composition dans le tableau suivant :

TABLEAU XXIX

Pourcentage des esters méthyliques des acides gras des «cires» chloroformiques brutes

Esters des acides en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17}cycl	C_{18}	$C_{18}:1$
%	2,4	10,8	44,4	7,6	4,8	6,1	17,5

Ces acides gras représentent 21 % du poids des «cires» de départ.

2°) - *Etude de la fraction hydrosoluble*

Après évaporation de HCl nous avons repris par de l'eau et chromatographié la phase aqueuse sur résines échangeuses d'ions (Dowex 50), nous obtenons ainsi deux fractions :

a) *fraction entraînée par l'eau*

Elle représente 28 % du poids de départ et se compose principalement de glycérol, identifié par chromatographie sur papier et sur plaque.

b) *fraction entraînée par une solution d'HCl N*

Le poids de cette fraction est de 25 mg soit 50 % du poids des cires. L'analyse par chromatographie sur papier et sur plaque montre la présence d'éthanolamine, de lysine, de glycine, d'alanine, d'acide aspartique, d'acide glutamique, de sérine, d'acide diaminopimélique ainsi que des traces de valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, proline, de glucosamine et de galactosamine. La composition quantitative de cette fraction peptidique est donnée dans le paragraphe suivant (composition des cires D).

3°) - *Recherche d'acides gras à longues chaînes*

Après saponification prolongée des cires, les acides gras à longues chaînes sont recherchés dans la phase éthérée, car leurs sels de potassium y sont solubles.

Par séparation sur colonne d'alumine, tous les produits sont élués par le benzène ou l'éther. Leur poids moléculaire déterminé par titration, est inférieur à 300. Les esters méthyliques distillent à 200° (0,1 mm de Hg). Il n'y a pas de résidu.

Leur analyse par chromatographie en phase gazeuse montre qu'il s'agit du même mélange d'esters méthyliques que dans le cas des autres fractions étudiées dans les chapîtres précédents. Il y a cependant un pic supplémentaire correspondant au phtalate de méthyle et dont nous discutons l'origine dans le chapitre des cires B.

II. — *ETUDE DES CIRES B, C, D.*

Le fractionnement par différence de solubilité dans le méthanol et l'acétone nous a permis d'isoler trois fractions (cires B, C, D) dont les résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince sont semblables : nous trouvons, après migration dans les trois systèmes de solvants utilisés pour les phospholipides (voir page 65) et révélation par H_2SO_4, I_2, molybdate, ninhydrine . . . , des produits de Rf identiques, mais dont les proportions, déterminées d'après l'intensité de la coloration des taches, varient. Il existe cependant des différences dans leurs propriétés analytiques (voir tableau XXX).

TABLEAU XXX

Données analytiques des cires B, C, D.

Fractions	Fusion	% N_2	% P	Spectre infrarouge
Cires B	47°—67°	1	2,4	Présence de bandes aromatiques
Cires C	145°—146°	2,8	1,4	Analogues à celui des phospholipides
Cires D	193°—220°	3	3,5	

A. — *CIRES B*

La séparation sur colonne de silice nous a permis d'isoler trois fractions :

a) *la première fraction éluée* (48 %) par le chloroforme, fusion 47°—67°, analysée par chromatographie sur couche mince dans le système chloroforme, méthanol, montre qu'il s'agit d'un mélange de deux produits au moins, l'un de Rf = 0,97, l'autre de Rf = 0,11 (révélés par l'acide sulfurique ou par des vapeurs d'iode, mais non par la ninhydrine).

Après hydrolyse alcaline, l'éthérosoluble contient les mêmes esters que les autres fractions et, en plus, un ester dont l'indice de rétention relatif en chromatographie en phase gazeuse est de 2,98 (par rapport au palmitate de méthyle, sur phase P). Ce pic représente 37 % des acides gras des cires B. Nous l'avons isolé. Son spectre infrarouge ainsi que le spectre ultraviolet sont ceux d'un composé aromatique (bandes dédoublées très intenses entre 1550 cm^{-1} et 1600 cm^{-1}, bandes de 710 à 740 cm^{-1}. Les maximums du spectre ultraviolet se situent à 266, 272 et 279 mμ).

Son indice de saponification ainsi que l'indice d'acide et le poids moléculaire sont identiques à ceux du phtalate de méthyle.

Dans la partie hydrosoluble nous avons identifié du glycérol.

Au cours de notre travail, nous avions déjà mis en évidence un composé aromatique qui se trouvait dans toutes les fractions. Nous l'avions alors identifié comme étant du phtalate de butyle (identifié par chromatographie en phase gazeuse des produits d'hydrolyse, par son spectre R.M.N., I.R., et par spectrométrie de masse), dont l'origine était due à l'emploi de bouchons et de tuyaux en matière plastique. ETEMADI (201) devait, par ailleurs, faire les mêmes observations. Nous avons donc éliminé l'utilisation de toute matière plastique, aussi bien pour la préparation du milieu de culture que pour les appareils de distillation des solvants.

L'origine de cet acide phtalique reste inexpliquée pour le moment, à moins qu'il ne provienne de la dégradation de la vitamine K. MANDEL et coll. (202, 203) ont, en effet, signalé la présence de vitamine K dans les lipides des formes L. Cette vitamine se trouve en partie dans les cires chloroformiques. D'autres auteurs (204) avaient déjà identifié de l'acide phtalique dans les lipides bactériens contenant également de la vitamine K.

L'acide phtalique, que nous avons isolé, provient de la saponification des cires chloroformiques. Cette saponification a été effectuée avec de la potasse méthanolique, à l'air libre. La vitamine K a donc pu être oxydée en acide phtalique. L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique de cires chloroformiques libère, par contre, très peu d'acide phtalique (moins de 2 %).

A titre de contrôle, nous avons entrepris des essais de saponification, à l'air libre, d'échantillons de vitamine K témoin. Après traitement habituel, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse du mélange des acides, transformés en esters méthyliques, a permis d'identifier des quantités relativement importantes (20 %) de phtalate de méthyle. Les mêmes expériences reprises sous atmosphère d'azote, ne donnent que des traces (environ 1 %) de phtalate de méthyle.

b) *les fractions éluées* (44 %) par le mélange chloroforme, méthanol, ont un comportement en chromatographie sur couche mince et des spectres infrarouges semblables à ceux des phospholipides.

c) *la fraction éluée* (8 %) par le méthanol contient un produit supplémentaire qui ne migre pas et qui réagit avec la ninhydrine. Ces fractions ont été réunies à celles obtenues après le fractionnement correspondant des cires D.

B. — *CIRES C*

En raison des faibles quantités de cires C elles n'ont pas été étudiées.

C. — *CIRES D*

Par rapport aux autres cires, elles se différencient par leur fusion plus élevée (193°—220°), leur teneur élevée en azote et phosphore, et leur pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{CHCl_3} = +3°$. On sépare par chromatographie sur couche mince les mêmes produits trouvés dans les autres fractions (cires B et C). Le produit ne migrant pas est le plus important. Leurs spectres infrarouges présentent des bandes à 1650—1600 cm^{-1} (-CO-NH-).

Leur séparation sur colonne donne :

a) une fraction entraînée par le chloroforme (6,2%), identique à celle isolée dans les cires B et qui par saponification libère en dehors des acides gras, de l'acide phtalique et du glycérol.

b) des fractions éluées par le chloroforme, méthanol 9/1 et 8/2 (67%) identifiées comme étant des phospholipides.

c) des fractions éluées par le mélange chloroforme, méthanol 5/5 et par le méthanol (26 %), que nous avons réunies.

L'étude de cette dernière fraction (Fusion 165—200°, P 1%, N_2 3%) montre qu'il s'agit d'un lipide associé à une partie peptidique. L'hydrolyse acide donne une partie éthérosoluble formée d'acides gras, dont nous donnons la composition après chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques.

TABLEAU XXXI

Composition du mélange d'esters d'acides gras de la fraction éluée par le chloroforme, méthanol 5/5 et par le méthanol

Esters des acides en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17}cycl	C_{18}	$C_{18}:1$
%	0,9	11,4	47,3	10,6	14,7	1,8	8,7

L'hydrosoluble contient du glycérol, et une fraction peptidique composée des mêmes acides aminés mis en évidence dans les cires brutes. La composition de cette fraction déterminée par la méthode de MOORE, SPACKMAN et STEIN (205) est donnée dans le tableau suivant :

TABLEAU XXXII

Composition de la fraction peptidique des cires (pour 100 d'éthanolamine)

Ethanolamine	Alanine	Acide glutamique	Lysine	Glycine	Acide aspartique	Sérine	Acide α-ε diaminopimélique
100	5	5	4	3	2	2	1

Ces proportions ont été déterminées par intégration de la courbe obtenue lors de l'analyse de l'hydrolysat avec un autoanalyseur Technicon. Les sucres aminés ne se trouvent qu'à l'état de traces.

III. — *LES LIPIDES LIES*

L'étude de ces lipides a été menée simultanément avec celle des cires D. Ils contiennent 1% de phosphore et 3% d'azote et se présentent sous forme de masse visqueuse entièrement fondue à 35°. La chromatographie sur couche mince de silice révèle la présence de trois substances de Rf identiques à ceux trouvés dans le cas des cires D. (Seul le produit ne migrant pas ne se trouve pas dans cette fraction.)

Après hydrolyse acide, nous avons identifié les mêmes acides gras que dans les autres fractions. L'analyse de leurs esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse est donnée dans le tableau suivant

TABLEAU XXXIII

Composition des esters méthyliques des acides gras des lipides liés

Esters des acides en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17}cycl	C_{18}	$C_{18}:1$
%	3,2	26	44,3	10,2	3,8	1,9	5,8

L'hydrosoluble contient du glycérol et du galactose ainsi que de l'inositol (mis en évidence par chromatographie sur couche mince) et des produits aminés en particulier l'éthanolamine et la sérine qui ont également été révélées par chromatographie sur couche mince. Les autres substances aminées n'ont pu être caractérisées qu'à l'état de traces.

IV. — *COMPARAISON AVEC LES FORMES BACTERIENNES NORMALES*

En raison des faibles quantités de cires présentes dans les formes bactériennes normales, nous ne les avons pas fractionnées. On retrouve cependant dans leur hydrolysat les mêmes acides gras que dans les cires des formes L. La fraction peptidique est composée des mêmes acides aminés, mais leur concentration est plus élevée (d'après l'intensité de la coloration par la ninhydrine des taches obtenues par chromatographie).

La présence, après purification répétée sur cellulose des cires D, d'une partie peptidique, ainsi que la teneur en phosphore, sembleraient indiquer que ces lipides sont des mélanges de phospholipides et de peptidolipides.

Les quantités très faibles de ces produits ne nous ont pas permis de les séparer complètement.

Les lipides liés, par contre, contiennent en plus des produits aminés, du galactose et de l'inositol. Ils ont la même composition que ceux de la forme normale et pourraient correspondre aux phosphatidopeptides mentionnés par MANDEL et coll. (152).

EXTRAIT CHLOROFORMIQUE ET LIPIDES LIES

I. — *PROPRIETES DES «CIRES CHLOROFORMIQUES»*

Les cires brutes contiennent 2% d'azote et 3% de phosphore. Elles sont souillées de phospholipides. Leur fusion n'est pas nette (157°—175°) $[\alpha]_D^{CHCl_3} = +2°,6$. (C=1).

La chromatographie sur couche mince de silice dans le système chloroforme méthanol, pyridine, eau, fait apparaître trois taches révélées par la ninhydrine (Rf=0,70, 0,35 et une tache allongée ne migrant pas, elles se révèlent également par le molybdate d'ammonium. Trois autres produits sont mis en évidence par des vapeurs d'iode ou l'acide sulfurique. (Rf = 0,97, 0,90, 0,11).

II. — *HYDROLYSE ACIDE*

5 1 mg de cires brutes sont hydrolysés pendant 6 heures par HCl N à reflux. Après évaporation de HCl sous vide on reprend par de l'eau et de l'éther.

1) *Identification des acides gras*

L'extrait éthéré, séché sur Na_2SO_4 anhydre, pèse, après évaporation de l'éther, 11 mg, soit 2,1 % du poids des cires de départ. Les acides ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques.

2) *Identification de l'hydrosoluble*

L'hydrosoluble a été filtré sur 2 g de Dowex 50. On isole ainsi deux fractions :

a) fraction entraînée par l'eau.

Elle contient principalement du glycérol. Le poids sec de cette fraction est de 14 mg, soit 28% du poids de départ. Par dosage colorimétrique, selon FAURE (162), on obtient 80 % de glycérol.

b) fraction entraînée par HCl, N.

Cette fraction a été hydrolysée par HCl 6 N pendant 10 heures. Après élimination de HCl nous avons étudié l'hydrolysat par chromatographie sur plaques. Les Rf sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXXIV

Chromatographie sur couche mince de l'hydrolysat acide des cires brutes

Plaques	Système de solvants en vol.		Ethanolamine Rf	Sérine Rf	Acide glutamique Rf	Alanine Rf	Hydrolysat Rf
Cellulose	n Butanol ac. acétique eau	60 20 20	0,37	0,28	0,35	0,32	0,37 0,28 0,35 0,32 0,12
Gel de silice	Phénol eau	75 25	0,37	0,20	0,10	0,29	0,37 0,27 0,20 0,10 0,05

La chromatographie bidimensionnelle sur papier de cet hydrolysat avec les mêmes témoins confirme la présence de ces acides aminés.

III. *SAPONIFICATION - RECHERCHE D'ACIDES GRAS A LONGUES CHAINES.*

600 mg de cires brutes sont dissous dans 15 ml de benzène et saponifiés pendant 72 heures par 5 ml de potasse éthanolique à 15%. Après concentration sous vide on reprend par 15 ml d'eau et plusieurs fois par le même volume d'éther.

a) La phase aqueuse contient les mêmes produits que l'hydrosoluble du paragraphe précédent : les sels de potassium d'acides gras, les acides aminés.

b) La phase éthérée contient l'insaponifiable, les acides gras et les sels de potassium des acides gras à longues chaînes éventuels qui sont solubles dans l'éther.

Après avoir lavé par HCl N, on évapore l'éther et récupère 420 mg de produit qui sont séparés sur colonne d'Al_2O_3, activité II, (30 g) fraction de 30 ml (tableau XXXV).

c) La chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques montre qu'il s'agit d'un mélange d'acides gras normaux et d'un pic correspondant au phtalate de méthyle identifié dans les «cires B».

TABLEAU XXXV

Chromatographie sur colonne d'alumine des acides des «cires brutes»

Eluant	Poids des fractions en mg	Fusion	PM* moyen déterminé par titration par rapport à l'acide benzoïque
Benzène	0		
«	60	30°	180
«	180	39°	250
«	90	37°	260
«	15	visqueux	240
Benzène/Ether 5/5	60	liquide	240
«	9		
«	0		
Benzène/Ac.acét. 0,1%	0		
« 0,2%	0		
«	0		

*PM : poids moléculaire.

IV. — *ETUDES DES CIRES B ET D*

Les spectres infrarouges, la chromatographie sur couche mince dans différents systèmes de solvants (tableau XXX) montrent que les cires B, C, D contiennent des constituants semblables.

1) *Etude des cires B*

250 mg de cires B sont séparés sur 10 g de silice et 5 g de célite. Les fractions de solvants recueillies sont de 30 ml. (tableau XXXVI)

TABLEAU XXXVI

Fractionnement sur colonne de silice des «cires B»

Fractions	Eluant	Poids en mg	Fusion	$[\alpha]_D$ $CHCl_3$	I. R.	Analyse par chromatographie sur couche mince dans le système (voir page 65) Révélation	Rf
I 1	Chloroforme	0	47°—67°	+3°,4	Bandes aromatiques	N—	0,97 (0,90)
2	«	51				P—	0,11
3	«	48					
4	«	10					
II 5	Chloroforme/ Méthanol 9/1	10,0	59°—65°	+2°,6	Analogue à celui des phospholipides	N+	0,70
6		22,4				P+	0,35
7	«	23,0					0,00
8	«	10,0					
III 9	« 8/2	20,0	59°—65°	+2°,2	«	N+	0,70
10	«	15,0				P+	0,35
							0,00
IV 11	« 5/5	5,0	165°—200°		«	N+	
12	«	5,0				P+	
V 13					«	ne migre pas	
14							
15	Méthanol	10,0	visqueux				

Nous avons réuni les fractions éluées par les mêmes systèmes de solvants car elles ont les mêmes propriétés. Seule la fraction I nous a particulièrement intéressés, les fractions II et III ont été réunies à celles obtenues dans les mêmes conditions pour les cires D : ce sont des phospholipides. Les dernières fractions IV et V ont également été réunies à celles obtenues dans le cas des «cires D» et sont étudiées dans le chapitre concernant les «cires D».

ETUDE DE LA FRACTION - I - DES CIRES B

80 mg de la fraction I sont hydrolysés par 10 ml de KOH méthanolique à 15 % pendant 6 heures. Après évaporation du méthanol, on reprend par de l'eau et de l'éther. On acidifie jusqu'à pH=1. La phase éthérée est séchée puis évaporée a sec. Le poids des produits extraits est de 52 mg.

a) *Identification des acides gras*

Les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. On identifie ainsi les mêmes acides gras que dans les autres fractions, mais il y a un pic supplémentaire (37 % des acides totaux) dont l'indice de rétention sur phase P est de 2,98 et correspond à celui du phtalate de méthyle.

TABLEAU XXXVII

Pourcentage des esters méthyliques des acides gras de la fraction - I - des cires B

Esters des acides en	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$C_{16}:1$	C_{17}cycl	C_{18}	$C_{18}:1$	x
%	1,5	6,8	38,1	4,8	3,1	3,9	4,5	37

ETUDE DE L'ESTER CORRESPONDANT AU PIC x

Le composé correspondant à ce pic a été piégé à la sortie de l'appareil. C'est un liquide ; $n^{20} = 1{,}5165$ (n théorique du phtalate de méthyle : 1,5168).

Le spectre infrarouge est superposable à celui du phtalate de méthyle ainsi que son spectre de RMN.

Son spectre U.V., dans le chloroforme, montre trois maximums pour les longueurs d'ondes 266, 272 et 279mμ.

Ces maximums sont caractéristiques du noyau aromatique et des doubles liaisons conjugées.

Indice de saponification

7,535 mg d'esters ont été saponifiés pendant 3 heures dans 1 ml de KOH éthanolique 0,1 N. On neutralise ensuite, après refroidissement, par de l'HCl 0,1 N. La chute de burette est de 0,420 ml (essais à blanc : 0,995 ml). L'indice de saponification = 0,427.

Indice d'acide

3,465 mg d'acide, obtenu par hydrolyse de l'ester, sont dissous dans 1 ml de mélange d'éther et d'éthanol (1 à 1 en volume), on neutralise en présence de phénolphtaléine par de la potasse aqueuse 0,1 N. Il faut 0,410 ml de KOH (essais à blanc 0,015). L'indice d'acide = 0,637.

L'analyse élémentaire effectuée sur l'ester méthylique donne la composition suivante:

Calc. %	C : 61,82	H : 7,15	0 : 30,00
Tr.	C : 62,01	H : 7,23	0 : 31,08

Le *poids moléculaire* déterminé par cryométrie dans le benzène est de 194.

b) *L'Hydrosoluble*

L'Hydrosoluble a été analysé, comme dans le cas des phospholipides et des graisses, par chromatographie sur couche mince ou sur papier. Nous y avons décelé du glycérol.

c) L'hydrolyse de cette fraction par HClN pendant 3 heures libère les mêmes acides gras ; le phtalate de méthyle n'y a pas été détecté en quantité notable.

2) *Etude des cires D*

500 mg de cires D sont séparés sur 30 g de silice et 15 g de célite, les fractions de solvant recueillies sont de 50 ml.

TABLEAU XXXVIII

Fractionnement sur colonne de silice des «Cires D»

Fractions		Eluant	Poids	Fusion	$[\alpha]_D^{CHCl_3}$	I.R.	Analyse par chromatographie sur couche mince	
							Révélation	Rf
I	1	Chloroforme	0					
	2	«	0			bandes aromatiques		
	3	«	10	47°—67°	+ 3°,4		N —	0,97
	4	«	15				P —	0,90
	5	«	5					0,11
II	6	Chloroforme/méthanol 9/1	20			analogues à celui des phospholipides		
	7	« «	30	59°—25°	+ 2°,7		P +	0,70
	8	« «	40				N +	0,35
	9	« «	20					0,00
III	10	« 8/2	20					
	11	« «	52					
	12	« «	56	59°—65°	+ 2°,2	»	«	«
	13	« «	80					
	14	« «	05					
IV	15	« 5/5	10					
	16	« «	30	185°—200°				
	17	« «	35	175°—210°	+ 2°,4	»	«	«
	18	« «	25	165°—200°				
	19	« «	10					
V	20	Méthanol	10	visqueux			ne migre pas ne se révèle pas	
	21	«	5					
	22	«	0					
	23	«	0					
	24	«	0					
	25	«	0					

a) la fraction 1 est identique à celle obtenue, dans les mêmes conditions, dans le cas des cires B.

b) les fractions II et III ont été réunies aux mêmes fractions obtenues après séparation des cires B : ce sont des phospholipides.

Cette fraction (fusion 59°-65°) contient 1,2 % d'azote et 2,8 %de phosphore.

Après hydrolyse par HCl N, de 100 mg pendant 6 heures à reflux, nous avons identifié les acides gras et déterminé leur composition qui est la même que celle des acides gras des phospholipides.

L'hydrosoluble contient de l'acide α-glycérophosphorique, de l'éthanolamine et de la sérine.

c) les fractions IV et V des cires D ont été réunies à celles correspondantes des cires B, car leur comportement en chromatographie sur couche mince est le même.

Les propriétés de ces fractions sont les suivantes :

Fusion = 165°—200° P : 1,1 % N : 3 %

Un échantillon de 50 mg de ces fractions a été hydrolysé par HCI N pendant 3 heures pour libérer les acides gras, qui sont extraits par de l'éther. Le poids de cette phase éthérée séchée sur Na_2SO_4 anhydre est de 17 mg, soit 34 % du poids de départ.

Les résultats de l'analyse par chromatographie de leurs esthers méthyliques sont donnés dans le tableau XXXVI, page 94.

L'hydrosoluble (poids 30 mg) a été filtré sur résines échangeuses d'ions (Permutite 50). On obtient ainsi deux fractions :

— la première fraction, éluée par de l'eau, contient du glycérol, identifié par chromatographie sur plaque dans les mêmes conditions que pour la phase hydrosoluble de saponification des graisses neutres (voir page 57). La recherche de sucres est restée négative.

Les proportions de glycérol, dosé selon FAURE (162), sont de 10 % par rapport au poids des lipides de départ.

— la deuxième fraction, éluée par une solution d'ammoniaque N, a été hydrolysée par HCl 6 N, pendant 16 heures. Après élimination de HCl, une partie de cet hydrolysat a été analysée dans un appareil automatique Tech-

nicon, étalonné préalablement ; nous avons ainsi mis en évidence tous les acides aminés précédents (cf page 92), plus la cystéine, l'acide aspartique, la proline, la valine, la leucine, l'isoleucine, la glycine et des sucres aminés : galactosamine et glucosamine.

V. LIPIDES LIES

120 mg de lipides liés sont hydrolysés par 5 ml d'HCl 6 N pendant 12 heures, à reflux. Après évaporation de HCl, le résidu est repris par de l'eau et de l'éther. Il reste une partie insoluble qui est séparée du reste par filtration. Son poids est de 24 mg. Ce produit n'a pas été identifié ; nous pensons qu'il s'agit de produits de dégradation d'acides aminés et éventuellement d'oses.

Les acides gras extraits par l'éther pèsent 42,5 mg. Ils sont ensuite transformés en leurs esters méthyliques, puis analysés par chromatographie en phase gazeuse. Leur composition est donnée dans le tableau XXXIII, page 89.

La chromatographie sur couche mince de la phase aqueuse dans le système butanol, acide acétique, eau, révèle la présence de glycérol, de galactose et d'inositol.

Les acides aminés trouvés ont été déterminés de la même façon que pour les cires D.

DEUXIEME PARTIE

Structure et biogénèse d'un nouveau type d'acides mycoliques de Mycobacterium smegmatis.

CHAPITRE I

Sur la structure d'un nouveau type d'acides mycoliques de Mycobacterium smegmatis

La présence dans les cires de *Mycobacterium smegmatis* d'un type d'acides mycoliques appelés acides α'-mycoliques, a déjà été rapportée (77). Ces acides ont 60 atomes de carbone environ et donnent par pyrolyse, de l'acide tétracosanoïque. Ils constituent environ 25% des acides mycoliques de cette espèce bactérienne (206).

Des acides mycoliques de ce type n'avaient encore jamais été signalés dans les lipides des Mycobactéries ; ASSELINEAU (91, 207) a bien mis en évidence un «acide hydroxylé», $C_{60}H_{120}O_3$, en très faible proportion (0,01 % du poids sec des bacilles), dans les lipides de deux souches humaines de *Mycobacterium tuberculosis* (souches Brévannes et H_{37} Rv Sr) ; cependant, la nature mycolique, très probable, de ces acides reste à déterminer.

L'existence d'acides mycoliques en C_{60} est intéressante du point de vue de la biogénèse des acides mycoliques et de la phylogénie de certaines espèces d'Actinomycétales (206); aussi nous a-t-il paru utile d'en étudier leur structure et leur biogénèse.

I. — *ISOLEMENT ET PURIFICATION*

Après saponification des bactéries, l'insaponifiable et les acides gras sont extraits par de l'éther puis traités par le méthanol à chaud. On sépare ainsi les acides mycoliques bruts insolubles.

Le mélange de mycolates de méthyle, obtenu par action du diazométhane, est ensuite chromatographié sur colonne

de gel de silice. On isole les fractions contenant les α'-smegmamycolates de méthyle. Ces derniers ont été purifiés par chromatographie préparative sur plaque de gel de silice G, puis sur gel de silice imprégné de $AgNo_3$. Nous avons constaté la présence d'une «impureté» (environ 10% du poids de l'échantillon). L'étude par spectrométrie de masse de l'impureté a montré qu'il s'agit principalement de deux homologues inférieurs d'esters méthyliques d'acides α-mycoliques en C_{68} et C_{70} (diinsaturés), (pic à m/e=382 correspondant au tétracosanoate de méthyle, pics à m/e=600 et 628 dus aux méromycolals, et enfin pics à m/e=964 et 992 attribués aux anhydro-mycolates). Notre étude concerne le produit principal.

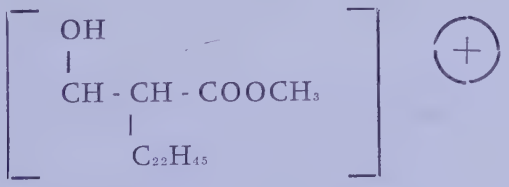
II. — *PROPRIETES DES α'-SMEGMAMYCOLATES DE METHYLE* (1 b)

F=50°—51°, $[\alpha]_D$=+2,8° ($CHCl_3$; c=11). L'analyse élémentaire est en accord avec la formule $C_{83}H_{124}O_3$.

Le spectre I.R. présente des bandes OH à 3535 cm^{-1}, 3580 cm^{-1} et 3620 cm^{-1} et des bandes carbonyles à 1724, 1744 cm^{-1}, indiquant la présence d'une chélation dans la molécule.

Le spectre de R.M.N. présente un triplet à 310—330 cps dû à une insaturation.

Le spectre de masse comporte les pics du tétracosanoate de méthyle (pic moléculaire à m/e=382, pics à m/e = M-31 et M-43, etc...) et ceux des aldéhydes méromycoliques (pics moléculaires à m/e=546, 574 et de faibles pics à m/e=528, 556 attribuables à M-18 pour ces aldéhydes). La présence des pics du tétracosanoate et des méroaldéhydes s'explique soit par réarrangement de l'ion moléculaire, soit par la pyrolyse des α'-mycolates de méthyle (78) : l'absence de pics à m/e=411 attribuable à l'ion (a) montre que la pyrolyse a eu lieu.



ion (a)

Tous ces résultats indiquent la nature α-ramifiée β-hydroxylée (nature «mycolique») des produits de départ, ainsi que la présence d'une insaturation dans ces composés.

III. — *PREPARATION DE DERIVES*

1) *Acétyl-α'-mycolates de méthyle :*

L'analyse élémentaire des α'-mycolates de méthyle est en faveur de la présence d'un seul hydroxyle dans la molécule ; pour le vérifier, nous avons préparé les acétyl-α'-mycolates de méthyle (Ic voir page 106).

$F=38—39°$, $[\alpha]_D=+4,6°$ ($CHCl_3$; $c=12$)

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule $C_{65}H_{126}O_4$.

Le spectre I.R. présente une bande d'absorption à 1245 cm^{-1}; il n'y a plus de bande OH sur le spectre.

Le spectre de R.M.N. présente un singulet à 121 cps attribuable aux protons du groupement acétyle. Son intensité est la même que celle du singulet à 219 cps dû aux protons du groupement méthyle de l'ester, ce qui montre la nature monohydroxylée des acides mycoliques de départ.

2) *α'-smegma-méromycolals :*

Par pyrolyse des α'-mycolates de méthyle, nous avons isolé d'une part le tétracosanoate de méthyle et d'autre part les méromycolals (II) que nous avons purifiés par chromatographie sur plaque. L'analyse élémentaire des aldéhydes ($F=35°$) est en accord avec la formule $C_{38}H_{74}O$.

Le spectre I.R. présente une bande d'absorption à 1737 cm^{-1} due au carbonyle et une bande à 2730 cm^{-1} due à la vibration C - H du groupement aldéhydique.

Le spectre de R.M.N. montre un triplet à 584 cps : il n'y a donc pas de ramification sur le carbone en α de ces aldéhydes et par conséquent sur le carbone en γ des mycolates de méthyle de départ. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés à propos d'autres acides mycoliques (206).

3) *α'-smegma-méromycolates de méthyle :*

L'oxydation des aldéhydes méromycoliques (II) par Ag_2O alcalin (181) donne les acides méromycoliques (IIIa) dont nous avons purifié les esters méthyliques par chromatographie sur plaque.

L'analyse de ces esters (F=38°—40°) est en accord avec la formule $C_{39}H_{76}O_2$.

Le spectre I.R. présente une bande carbonyle à 1746 cm^{-1}.

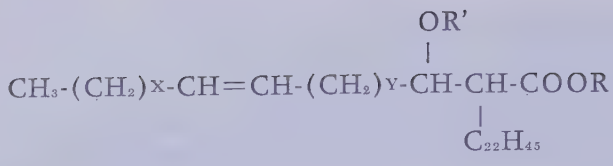
Le spectre de R.M.N. montre le triplet à 310-330 cps indiquant l'existence d'une insaturation et un singulet à 219 cps dû aux protons du groupement méthyle de l'ester.

Le spectre de masse montre des pics à m/e=544 et 572. Ces pics sont ceux des fragments à m/e=M-32 pour ces esters monoinsaturés. Cette interprétation est en accord avec les résultats obtenus sur les spectres de masse des α'-méromycolals (on observe les pics moléculaires de ces aldéhydes), ainsi qu'avec les résultats de la spectrométrie de masse des méromycolates de méthyle hydrogénés.

4) *Dihydro-α'-smegma- méromycolates de méthyle :*

Le spectre de masse du produit hydrogéné, F=65-70°, montre des pics moléculaires à m/e=578 et 606, ce qui confirme la présence d'une insaturation dans les méromycolates.

Nous constatons également la présence sur ce spectre de pics à m/e=535 et 563 (M-43) et d'autres à m/e=547 et 575 (M-31), mais ces derniers sont nettement moins importants. Il existe aussi la série des pics attribués aux fragments $(CH_2)n$ - $COOCH_3$ (75, 76); le plus important se trouve à m/e=143. Ces résultats indiquent la nature linéaire de ces composés. La présence d'un pic important à m/e=74 confirme, par ailleurs, l'absence d'une ramification en α. On peut donc écrire la structure générale Ia pour les acides α'-smegmamycoliques :



$x = 15, 17$
$y = 17, 19$

Ia $R = H$ $R' = H$
Ib $R = CH_3$ $R' = H$
Ic $R = CH_3$ $R' = -C(=O)-CH_3$

pour les α'-smegma-méromycolals, la structure II

$$CH_3 - (CH_2)_x - CH = CH - (CH_2)_y - CHO$$
II

et pour les acides α'-smegma-méromycoliques, la structure III

$$CH_3 - (CH_2)_x - CH = CH - (CH_2)_y - COOR$$
III a $R = H$
III b $R = CH_3$

IV. — *LOCALISATION DE LA DOUBLE LIAISON*

Afin de déterminer la place de la double liaison dans ces molécules, nous avons effectué des ozonolyses et des oxydations dont les résultats sont résumés dans le tableau suivant. (Tableau IXL).

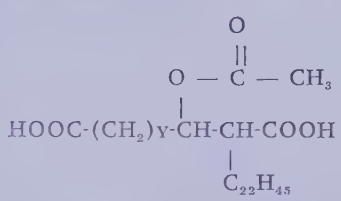
1) *Ozonolyse des α'-smegma-méromycolates de méthyle :*

Après ozonolyse et destruction oxydative des ozonides par H_2O_2 à 35 vol., les produits ont été traités par le CH_2N_2 et séparés par chromatographie préparative sur plaque. On obtient principalement deux fractions : l'une correspond à des monoesters, l'autre à des diesters ; chacune de ces fractions a été analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Le chromatogramme des monoesters a montré des pics d'esters de C_{15} à C_{21}, les deux pics les plus importants étant

TABLEAU IXL

Résultats obtenus après ozonolyse oxydative des acides α'-smegmamycoliques et de certains de leurs dérivés

Esters soumis à l'ozonolyse	Fragments obtenus par ozonolyse oxydative		
	a	b	c
III b	CH_3-$(CH_2)_x$-COOH	HOOC-$(CH_2)_y$-COOH	
I c	CH_3-$(CH_2)_x$-COOH		
V b		HOOC-$(CH_2)_y$-COOH	$C_{22}H_{45}$-COOH

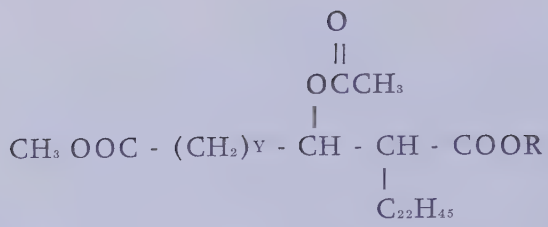
ceux de l'heptadécanoate de méthyle et du nonadécanoate de méthyle ; le pic du nonadécanoate de méthyle est prédominant.

Le chromatogramme des diesters a montré les pics d'esters d'acides dicarboxyliques de C_{15} à C_{23}, les deux pics prédominants étant ceux d'esters des acides en C_{19} et C_{21}.

L'identification des mono- et des diesters a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec des produits témoins et la vérification de la nature des esters de certains pics par spectrométrie de masse (notamment la structure du nonadécanoate de méthyle et celle du nonadécanedioate de méthyle, qui constituent les pics les plus importants).

2) *Ozonolyse des acétyl-α'smegmamycolates de méthyle.*

Les mêmes expériences ont été reprises avec les acétyl-α'-mycolates de méthyle (Ic). Nous avons isolé, par chromatographie préparative sur plaque, une fraction composée de monoesters et une 2e fraction contenant le produit IV b.



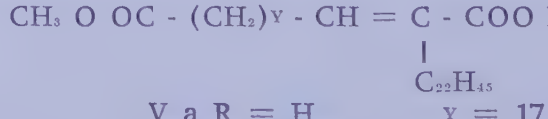
IV a R = H
IV b R = CH_3

La nature des monoesters est identique à celle des monoesters obtenus par ozonolyse des méromycolates de méthyle ; ici également les esters à nombre impair d'atomes de carbone sont dominants, le nonadécanoate de méthyle notamment est quantitativement le plus important.

Le composé IV b, F = 45°, a été étudié plus en détail :

Son spectre de R.M.N. montre deux singulets de même importance à 213 cps et 215 cps dus aux protons de deux groupements méthyles du diester. Le singulet à 116 cps est attribuable aux trois protons du groupement acétyle ; ce singulet est de même importance que chacun des deux autres. Par ailleurs, on ne trouve pas de signal de protons oléfiniques. Le composé que nous avons isolé semble donc avoir la structure IV b.

Pyrolyse du Composé IV b : Par cette réaction, il y a départ d'acide acétique ; le résidu, le composé V b, a été isolé :



V a R = H
V b R = CH_3
y = 17, 19

Sur le spectre I.R. de ce composé (F=48°), une bande apparaît à 1640 cm^{-1} (attribuable à une double liaison conjuguée).

Le spectre U.V. présente une bande d'absorption à 218 mμ. (ε_{218}=12.500; cyclohexane).

Le spectre de R.M.N. montre des signaux à 219 et 221 cps dus aux protons des deux groupements méthyles de diesters ; le singulet à 116 cps (dû au groupement acétyle) a disparu, mais un triplet à 395—409 cps apparaît (attribué aux protons se trouvant sur le carbone en β du carboxyle).

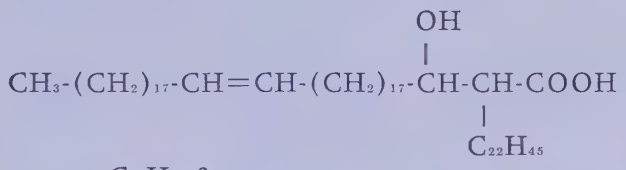
Ozonolyse du Composé V b : Cette ozonolyse a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, les produits de la réaction sont traités par le diazométhane ; on isole par chromatographie préparative sur plaque les mono- et les diesters, et chacune de ces fractions est chromatographiée en phase gazeuse.

La fraction des monoesters est constituée principalement de tricosanoate de méthyle (cochromatographie avec le produit synthétique et spectrométrie de masse).

Les diesters forment un mélange où dominent les esters des diacides en C_{15}, C_{17}, C_{19}, C_{21}, C_{23}. Les pics les plus importants sont ceux du nonadécanedioate de méthyle et du heneicosanedioate de méthyle.

V. — *CONCLUSION*

La structure Ia des acides α'-smegmamycoliques découle de l'ensemble des résultats rapportés ici. Le représentant dominant dans ce mélange a la structure VI :



$C_{62}H_{122}O_3$

VI

On constate que les acides α'-smegmamycoliques constituent un nouveau type d'acides mycoliques : l'acide obtenu par pyrolyse est l'acide tétracosanoïque qui constitue l'acide de pyrolyse de certaines Mycobactéries, mais le squelette hydrocarboné des fragments méromycoliques est, à une ou deux doubles liaisons près, de type méronocardique tel qu'il a été signalé dans le cas de *Nocardia asteroïdes* (80).

Dans le deuxième paragraphe, nous étudierons la biogénèse de ces acides «hybrides» et nous discuterons la signification de leur présence chez une Mycobactérie.

I. — *ISOLEMENT ET PURIFICATION*

Mycobacterium smegmatis a été cultivé sur 8 litres de milieu de SAUTON (208) (40 boîtes de Roux) pendant une dizaine de jours. Les bactéries filtrées et encore humides ont été soumises au traitement par la potasse méthanolique à 5% pendant 4 heures. On extrait ensuite l'éthérosoluble. Celui-ci, séché sur Na_2SO_4 anhydre, pèse 8 g. Pour séparer les acides mycoliques des acides banaux, le mélange est traité à plusieurs reprises par 80 ml de méthanol à l'ébullition. L'insoluble (5 g) est ensuite traité par le diazométhane et chromatographié sur 100 g de gel de silice. Les fractions recueillies sont de 200 ml.

Les résultats de cette chromatographie sont résumés dans le tableau XL.

Les α'-smegmamycolates de méthyle sont élués par le mélange éther de pétrole-benzène (55/45). Sur plaques, ils migrent moins que les α-smegmamycolates de méthyle. Leur purification a été continuée par chromatographie sur plaque dans le solvant éther de pétrole-éther (80/20), jusqu'à ce qu'ils ne donnent plus qu'une seule tache :

F = 50—51° ; $[\alpha]_D = + 2{,}8°$.

Analyse $C_{63}H_{124}O_3$:

Calc. % :	C	81,46	H	13,36	O	5,17
Tr. :		81,37		13,37		5,50

II. — *PREPARATION DES DERIVES*

1) *Acétyl-α'-smegmamycolates de méthyle*

143 mg d'α'-smegmamycolates de méthyle ont été dissous dans 2 ml de pyridine. On ajoute le mélange contenant 1 ml de pyridine et 1 ml d'anhydride acétique et on abandonne une nuit à 37°.

Après le traitement habituel, on obtient 141 mg d'acétyl-α'-smegmamycolates de méthyle.

Les acétates ont été purifiés sur colonne de gel de silice (tableau XLI).

TABLEAU XL

Chromatographie du mélange d'acides mycoliques

Fractions	Eluant		Vol.	Poids en mg	Séparation sur couche mince dans le syst. E. de P./Ether 8/2
1	Ether de pétrole		200	0	
2	«		200	0	
3	«		200	3,8	
4	Ether de P/Benzène	95/5	200	0	
5	«	90/10	200	0	
6	«	85/15	200	57	
7	«	80/20	200	98	Acides gras normaux
8	«	75/25	200	57	
9	«	70/30	200	193	
10	«	70/30	200	52	
11	«	65/35	200	60	
12	«	60/40	200	169	préα-+α'-mycoliques
13	«	60/40	200	270	
14	«	60/40	200	601	
15	«	60/40	200	570	
16	«	60/40	200	566	
17	«	60/40	200	574	α-+α'-mycoliques
18	«	60/40	200	650	
19	«	55/45	200	300	
20	«	55/45	200	150	
21	«	55/45	200	111	
22	«	50/50	200	10	
23	«	45/55	200	15	
24	«	40/60	200	12	
25	«	30/70	200	13,5	
26	«	20/80	200	11,0	
27	«	15/85	200	10,0	
28	«	10/90	200	12,0	
29	Benzène		200	10,0	
30	Benzène/Ether	90/10	600	700	β-mycol.
31	Benzène/Ether	90/10	200	21	

TABLEAU XLI

Chromatographie des acétates sur 5 g de gel de silice (fractions de 10 ml)

Fractions	Eluant		Poids en mg	Séparation sur couche mince dans le syst. E. de P./ Ether 90/10
1	Ether de Pétrole		0	
2	Ether de P/Benzène	95/5	0,9	
3	«	95/5	0	
4	«	90/10	0	
5	«	85/15	0	
6	«	80/20	0	
7	«	75/25	0	
8	«	70/30	3,6	
9	«	70/30	0	
10	«	65/35	5,3	
11	«	65/35	22,3	
12	«	65/35	25,0	
13	«	65/35	21,0	
14	«	65/35	20,1	
15	«	65/35	11,0	1 seule tache
16	«	65/35	8,1	
17	«	65/35	5,0	
18	«	65/35	3,4	
19	«	65/35	3,0	
20	«	65/35	1,1	
21	«	50/50	3,0	
22	«	50/50	1,0	
23	«	40/60	2,5	
24	«	40/60	1,0	
25	Benzène/éther	90/10	3,0	

On obtient ainsi 125 mg de produit ne donnant qu'une seule tache par chromatographie sur plaque.

F = 38—39° ; $[\alpha]_D = +4{,}6°$

Analyse $C_{65}H_{126}O_4$:

Calc. % :	C	80,41	H	12,99	O	6,59
Tr. :		80,08		13,02		6,65

2) *Méromycolals (Pyrolyse)*

Dans une première expérience, nous avons pyrolysé 110 mg d'α'-smegmamycolates de méthyle jusqu'à 300°, sous 0,01 mm de Hg. Le tétracosanoate et les aldéhydes méromycoliques distillent ensemble dans ces conditions.

Dans une deuxième expérience, nous avons pyrolysé 170 mg d'α'-smegmamycolates de méthyle jusqu'à 300° sous le vide de la trompe à eau. On arrive ainsi à séparer le tétracosanoate de méthyle des aldéhydes. On obtient 64 mg de tétracosanoate pour 98 mg d'aldéhydes qui ont été purifiés sur plaque. F = 35°;

Analyse $C_{38}H_{74}O$:

Calc. % :	C	83,51	H	13,55	O	2,93
Tr. :		83,59		13,27		3,08

3) *Méromycolates de méthyle*

Oxydation selon ASINGER (181): 100 mg d'aldéhydes sont traités par 200 mg de $AgNO_3$ et 12,5 ml de NaOH à 10%, pendant 3 heures, à 80°. On isole ensuite 102 mg d'éthérosoluble qui sont traités par le diazométhane, puis purifiés par chromatographie sur plaque. On obtient ainsi 81 mg d'α'-méromycolates de méthyle ne donnant qu'une seule tache par chromatographie sur plaque. F = 38—40° ;

Analyse $C_{39}H_{76}O_2$:

Calc. % :	C	81,26	H	13,19	O	5,43
Tr. :		81,52		13,38		5,00

4) *Dihydro-méromycolates de méthyle*

L'hydrogénation a été effectuée sur 5 mg d'α'-méromycolates de méthyle, en présence de 10 mg PtO_2, dans l'acétate

d'éthyle, à la température ambiante. Le produit obtenu, après purification sur plaque, a un point de fusion de 65-70°.

III. — *LOCALISATION DES DOUBLES LIAISONS*

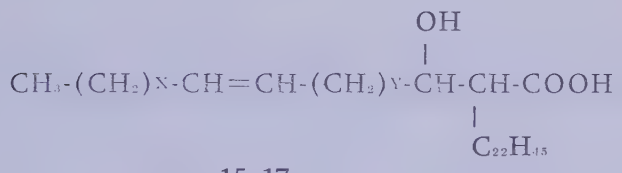
100 à 200 mg de substance sont dissous dans 3 ml de tétrachlorure de carbone. Dans la solution, maintenue à —18°, on fait passer pendant 15 minutes de l'oxygène contenant 8% d'ozone (débit : 0,2 l/min.). Après évaporation de la majeure partie du solvant, on reprend les ozonides par de l'éther. Cette solution est ensuite introduite par petites portions dans un ballon contenant 10 ml d'H_2O_2 (à 35 vol.), sous forte agitation. Lorsque tout l'éther est évaporé, on chauffe sous reflux pendant 3 heures. On extrait ensuite les acides qu'on estérifie par le diazométhane.

L'ozonolyse oxydative de 50 mg d'acétyl-α'-mycolates de méthyle donne, après séparation par chromatographie sur couche mince, principalement deux fractions : la première (20 mg), de Rf assez élevé, a été identifiée comme étant un mélange de monoesters, la deuxième (25 mg), plus retenue, correspond au produit IV b.

CHAPITRE II

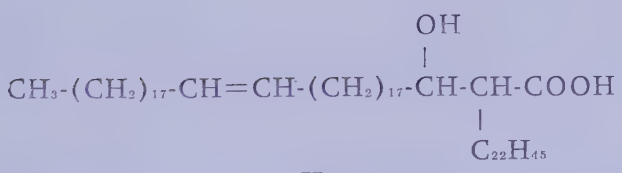
Biogénèse des acides α' mycoliques

Dans le chapitre précédent nous avons proposé la structure I pour les acides α'-smegmamycoliques isolés de M. smegmatis.



x = 15, 17
y = 17, 19

I



II

Un représentant prédominant de ce mélange a la structure II. Il nous a paru intéressant de préciser la biogénèse de ces acides.

Le schéma suivant a été récemment proposé pour la biogénèse des acides mycoliques en général (206).

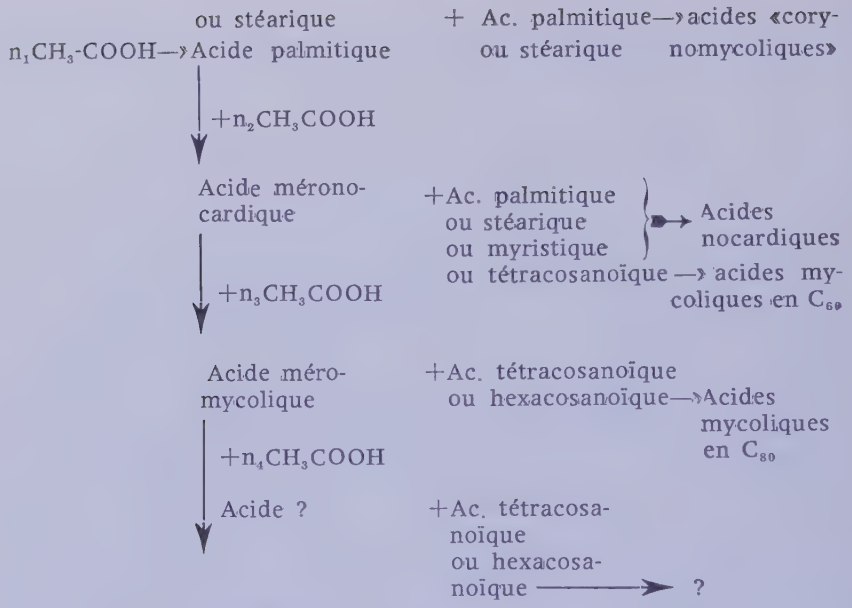


Schéma simplifié de la biogénèse des acides mycoliques. Les points d'interrogation indiquent l'emplacement des acides hypothétiques.

Selon ce schéma, deux unités d'acides gras, le plus souvent les acides palmitique et stéarique, se condensent pour former les «acides corynomycoliques» isolés de Corynébactéries.

Chez les Nocardia, l'acide palmitique (ou oléique ou stéarique) subit un allongement de chaîne pour aboutir à un acide linéaire à environ 32 à 38 atomes de carbone qui subit alors la «condensation mycolique» pour donner les acides nocardiques.

Chez les Mycobactéries, dans une première étape, l'acide palmitique ou stéarique subirait des condensations avec des unités acétiques pour arriver à un acide linéaire de type méronocardique ; un tel acide pourrait alors subir une «condensation mycolique» pour donner naissance à l'acide «mycolique en C_{60}» de certaines Mycobactéries, ou encore plus généralement, servir de deuxième «relais» pour de nouvelles condensations avec des unités acétiques. Les longues chaînes hydrocarbonées des acides méromycoliques

prendraient alors naissance. (Nous faisons abstraction dans ce travail des mécanismes d'activation des unités entrant en condensation.)

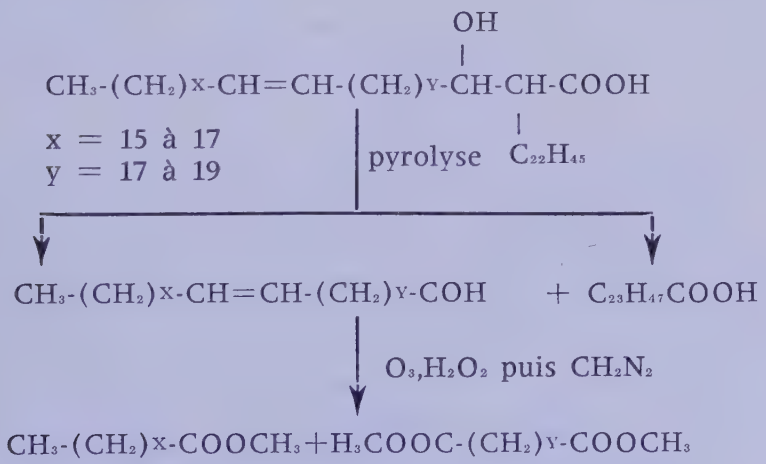
Les résultats rapportés dans ce travail semblent être en faveur de ce schéma.

I. — *ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ACIDES α'-SMEGMAMYCOLIQUES*

Les acides α'-smegmamycoliques obtenus par incubation en présence d'acide palmitique 1-^{14}C (activité totale $20{,}9 \times 10^6$ c/min) de la même souche de *Mycobacterium smegmatis* que celle étudiée précédemment, sont radioactifs. Après isolement par chromatographie sur colonne, et après purification par chromatographie sur plaque, leurs esters méthyliques, 133 mg, présentent $2{,}7 \times 10^5$ c/min, soit 2030 c/min/mg.

II. — *DEGRADATION*

Les α'-smegmamycolates de méthyle ont été dégradés selon le schéma suivant :



La pyrolyse de 128 mg de ces esters fournit du tétracosanoate de méthyle (50,6 mg), de radioactivité spécifique égale à 1030 c/min/mg. Les méromycolals 70 mg ont, après purification, une activité de 2300 c/min/mg.

Ces résultats, résumés dans le tableau XLII montrent l'incorporation du carbone isotopique dans les deux fragments de la pyrolyse ; il était alors intéressant d'en étudier la distribution. Nous avons donc soumis chacun de ces deux fragments à la dégradation.

TABLEAU XLII

Résultats des mesures de la radioactivité des α'-smegmamycolates de méthyle et des fragments de leur pyrolyse

Produit examiné	α'-smegmamycolates de méthyle	Aldéhydes méromycoliques	Tétracosanoate de méthyle
c/min/mg	2030	2300	1030

A. — *Dégradation du tétracosanoate de méthyle*

Un échantillon de tétracosanoate de méthyle présentant 4635 c/min, soumis à la décarboxylation selon SCHMIDT et PHARES (63, 64, 209), a donné 130 c/min pour le carbone 1, soit 2,8% ; un autre échantillon de même radioactivité a été soumis à l'oxydation sulfochromique selon KUHN et ROTH (61, 210). Nous avons trouvé 220 c min dans l'acide acétique formé, soit 4,7% de la radioactivité de départ. Ces résultats sont résumés dans le tableau XLIII.

TABLEAU XLIII

Pourcentage de la radioactivité présenté par le carbone 1 et les carbones 23 et 24 du tétracosanoate de méthyle

Tétracosanoate de méthyle	Carbone 1	Carbones 23 et 24
100	2,8	4,7

De ces données nous retiendrons :

a) qu'il y a eu distribution au hasard de la radioactivité;

b) que celle-ci ne semble pas pouvoir expliquer toute la radioactivité du tétracosanoate de méthyle. Si on se base sur les résultats de la réaction de KUHN-ROTH par exem-

ple, la distribution au hasard de la radioactivité devrait donner 600 c/min/mg environ pour le tétracosanoate de méthyle, soit 60 % de sa radioactivité.

Une partie de la radioactivité de l'acide tétracosanoïque semble donc localisée sur le carbone 16.

B. — *Dégradation des méromycolals*

Nous avons soumis les aldéhydes méromycoliques à l'ozonolyse oxydative. Après estérification par le diazométhane, les produits d'ozonolyse ont été fractionnés par chromatographie sur couche mince en mono- et diesters. Les monoesters présentent 4.000 c/min/mg, alors que les diesters ne présentent que 700 c/min/mg. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau XLIV.

TABLEAU XLIV

Radioactivité comparée des aldéhydes α'-smegmaméromycoliques et des produits provenant de leur ozonolyse

Produit examiné	α'-smegmaméro-mycolals	Monoesters	Heptadécanoate de méthyle	Nonadécanoate de méthyle	Diesters
c/min/mg	2300	4000	4000	4060	700

On constate que les monoesters constituent la fraction la plus radioactive. L'heptadécanoate de méthyle ainsi que le nonadécanoate de méthyle ont été purifiés par chromatographie en phase gazeuse : la radioactivité de ces deux produits est pratiquement identique (tableau XLV). L'heptadécanoate a ensuite été dégradé de la manière suivante :

Un échantillon de ce composé présentant 1600 c/min a été dilué avec du produit non radioactif et soumis à la décarboxylation selon SCHMIDT et PHARES. La radioactivité récupérée dans le CO_2 est de 58 c/min (3 à 4% de la radioactivité de départ) alors que la radioactivité trouvée dans l'héxadécylamine est de 1300 c/min (81% de la radio-

activité de départ). Cette amine est oxydée en acide palmitique par oxydation permanganique (sa pureté a été contrôlée par chromatographie en phase gazeuse de son ester méthylique). Un échantillon de cet acide, présentant 710 c/min, est soumis à la décarboxylation : la radioactivité du CO_2 récupéré est de 500 c/min, soit 71% de la radioactivité de l'acide palmitique, alors que la pentadécylamine ne présente que 85 c/min, soit 12% de la radioactivité de départ. Nous avons résumé ces résultats dans les tableaux XLV et XLVI suivants :

TABLEAU XLV

Radioactivité comparée de l'heptadécanoate de méthyle et des produits provenant de sa décarboxylation

Produit examiné	Heptadécanoate de méthyle	Hexadécylamine	CO_2
c/min.	1600	1300	58
%	100	81	3,6

TABLEAU XLVI

Radioactivité comparée de l'acide palmitique (obtenu par oxydation de l'hexadécylamine) et des produits de sa décarboxylation

Produit examiné	Acide palmitique	Pentadécylamine	CO_2
c/min.	708	85	500
%	100	12	71

Des résultats des tableaux XLV et XLVI nous retiendrons :

a) que, s'il y a distribution au hasard de la radioactivité dans l'heptadécanoate de méthyle, elle ne peut expliquer que 20 à 30% environ de la radioactivité de ce produit.

b) que 70 à 80% environ de la radioactivité sont localisés dans le carbone 2 de cet acide.

Une expérience parallèle effectuée sur le nonadécanoate de méthyle, dégradé carbone par carbone, montre également que 70 à 75% de la radioactivité sont localisés sur le carbone 4.

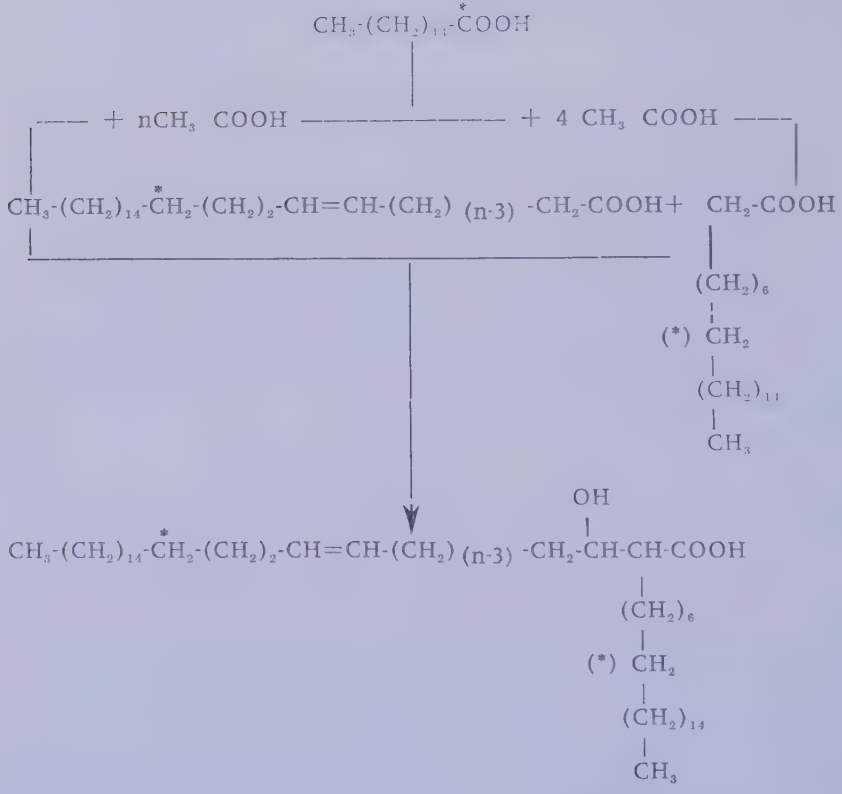
Il est donc évident que l'acide palmitique a servi d'initiateur pour la biogénèse du fragment méromycolique des acides α'-smegmamycoliques.

Ces données, ainsi que celles résultant de la réaction de KUHN-ROTH sur le tétracosanoate de méthyle, permettent de conclure que la radioactivité des diesters provenant de l'ozonolyse des α'-smegma-méromycolals peut s'expliquer, aux erreurs d'expériences près, par une distribution au hasard, due au catabolisme de l'acide palmitique introduit dans le milieu de culture.

CONCLUSION ET DISCUSSION

On peut donc proposer la voie de biogénèse suivante pour les acides α'-smegmamycoliques :

Schéma de la biogénèse des «acides mycoliques en C 60»



On constate que cette voie de biogénèse ainsi que la structure des acides α'-smegmamycoliques sont en accord avec les prévisions du schéma proposé pour la biogénèse des acides mycoliques (206).

Notons que les fragments méromycoliques et l'acide tétracosanoïque semblent avoir un métabolisme différent étant donné la grande disproportion entre la radioactivité

des monoacides de l'ozonolyse des méroaldéhydes et celle de l'acide tétracosanoïque.

Très récemment KANEMASA et GOLDMAN (211) ont suggéré une autre hypothèse pour la biogénèse des acides mycoliques. Selon ces auteurs, les acides mycoliques devraient être synthétisés par fixation d'unités entières d'acides gras par un mécanisme de condensation «tête à queue», une telle hypothèse, outre qu'elle rencontre des difficultés théoriques, est en contradiction avec les observations in vivo sur la biogénèse des acides α-smegmamycoliques de *M. smegmatis* (212) et des acides nocardiques de *N. asteroides* (213). Les expériences que nous venons de décrire les infirment également.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. - *Culture des bactéries*

Nous avons utilisé une souche de *Mycobacterium smegmatis* provenant de l'Institut Pasteur. Les bactéries ont été cultivées sur 2 litres de milieu de SAUTON (10 boîtes de Roux) en présence de 47µc d'acide palmitique - $1^{14}C$ (activité totale 20,9 x 10^6 c/min). *)

II. - *Isolement des α'-smegmamycolates de méthyle*

Les bactéries ont été filtrées et, encore humides, traitées avec 150 ml de potasse méthanolique à 5 % pendant 4 heures sous reflux. On acidifie et on sépare l'étherosoluble : 3 g. A partir de ce mélange, on sépare 1 g d'acides mycoliques bruts, insolubles dans le méthanol à ébullition. Ces acides ont ensuite été traités par le diazométhane et les esters méthyliques chromatographiés sur colonne de gel de silice (30 g). Les fractions éluées par le mélange éther de pétrole/benzène, 60/40 ont été purifiées par chromatographie sur plaque. On sépare ainsi 133 mg d'α'smegmamycolates de méthyle, ne donnant par chromatographie sur couche mince selon LANEELLE (54) qu'une seule tache de Rf identique à celui d'α'semgmamycolates authentiques. La radioactivité totale de ces esters est de 2,7 x 10^5 c/min (activité spécifique 2030 c/min), soit 1,3 % de la radioactivité de l'acide palmitique introduit dans le milieu de culture.

III. - *Pyrolyse des α'smegmamycolates de méthyle*

Un échantillon de 128 mg d'α'smegmamycolates de méthyle (activité 2030 c/min/mg) a été pyrolysé dans un tube à boule sous le vide d'une trompe à eau à 300°. On obtient 50,6 mg de tétracosanoate de méthyle présentant, après purification par chromatographie en phase gazeuse, 1030

*) Ces mesures, ainsi que d'autres rapportées dans ce travail, ont été effectuées sur un appareil Nuclear Chicago Gas-Flow Counter ayant un rendement d'environ 20 %.

c/min/mg ; le résidu 70 mg contient essentiellement les aldéhydes méromycoliques qui, après purification par chromatographie sur plaque, présentent une radioactivité de 2300 c/min/mg.

IV. - *Décarboxylation selon SCHMIDT et PHARES du tétracosanoate de méthyle.*

4,5 mg de tétracosanoate de méthyle (activité totale 4635 c/min) ont été mélangés à 10 mg de tétracosanoate de méthyle non radioactif et traités avec 20 mg de NaN_3 en présence de 1 ml de H_2SO_4 concentré, à 65°—70° pendant 3 heures.

Le CO_2 marqué est entraîné par un courant d'azote dans une solution de NaOH. On précipite du $BaCO_3$ en ajoutant 2 ml d'un solution à 12 % de $BaCl_2$, en présence de quelques gouttes d'une solution de NH_4Cl. On centrifuge, et on lave plusieurs fois $BaCO_3$ par de l'eau (jusqu'à neutralité). L'activité totale du $BaCO_3$ est de 130 c/min, soit 2,8 % de la radioactivité du tétracosanoate de méthyle.

V. - *Dégradation selon KUHN et ROTH du tétracosanoate de méthyle*

Ces expériences ont été réalisées dans les conditions suivantes, décrites par ailleurs (214) : 4,5 mg de tétracosanoate de méthyle (radioactivité totale 4635 c/min) ont été soumis à l'oxydation sulfochromique (2 ml H_2SO_4+5 ml d'une solution contenant 84 g de Cr_2O_3 dans 50 ml d'eau) selon KUHN et ROTH dans un tube scellé à 120° pendant 2 heures. On transvase ensuite le mélange dans l'appareil décrit par les auteurs. L'acide acétique formé est distillé et neutralisé au fur et à mesure par une solution de NaOH (env. 0,1 N). On arrête la distillation quand le distillat ne présente plus de radioactivité. La radioactivité totale de l'acétate de sodium est de 220 c/min, soit 4,7 % de la radioactivité du tétracosanoate de méthyle.

VI. - *Ozonolyse oxydative des méromycolals*

Un échantillon de 72 mg de méromycolals a été ozonolysé pendant 15 minutes. Les ozonides récupérés ont été

ensuite soumis à la destruction oxydative par 10 ml d'H_2O_2 (35 Vol.) pendant 4 heures sous reflux. On obtient 80 mg d'éthérosoluble qui sont traités par le diazométhane. Les mono- et les diesters ont été isolés comme nous l'avons décrit précédemment (chapitre I). Les monoesters présentent 4000 c/min/ mg et les diesters 700 c/min/mg. L'heptadécanoate et le nonadécanoate de méthyle ont été ensuite isolés par chromatographie en phase gazeuse. Ces composés présentent respectivement 4000 c/min/mg et 4060 c/min/mg.

VII. - *Décarboxylation de l'heptadécanoate de méthyle selon SCHMIDT et PHARES.*

0,400 mg d'heptadécanoate de méthyle radioactif (activité totale 1600 c/min) a été mélangé à 12 mg d'acide heptadécanoïque non radioactif et traité comme décrit pour la décarboxylation du tétracosanoate de méthyle. L'activité totale du $BaCO_3$ recueilli est de 58 c/min. L'hexadécylamine isolée -(10 mg) a une activité spécifique de 130 c/min/mg. L'acide n'ayant pas réagi présente une radioactivité de 20 c/min.

VIII. - *Oxydation permanganique de l'hexadécylamine*

9 mg d'amine (activité totale 1170 c/min) ont été dissous dans 8 ml d'acétone à chaud, on ajoute, sous forte agitation 2 ml d'une solution à 5 % de $KMnO_4$ et on chauffe sous reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, on acidifie et on extrait l'acide palmitique par de l'éther. Les produits d'oxydation sont ensuite estérifiés par CH_2N_2. On isole par chromatographie en phase gazeuse, 6 mg de palmitate de méthyle présentant 710 c/min, soit 128 c/min/mg.

IX. - *Décarboxylation de l'acide en C_{16}*

On soumet les 6 mg d'acide palmitique (activité totale 710 c/min) à la décarboxylation selon SCHMIDT et PHARES. Le $BaCO_3$ recueilli présente 500 c/min et la pentadécylamine (5 mg) une activité spécifique de 17 c/min/mg.

CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail nous étudions les lipides de la forme L de *Proteus mirabilis* (P18).

La méthode d'extraction et de fractionnement d'ANDERSON que nous avons utilisée pour l'étude des lipides de la forme L ne semble pas être très appropriée à notre matériel, car nous avons retrouvé des phospholipides dans toutes les fractions; elle a cependant l'avantage de nous donner un nombre limité de fractions, enrichies en produit que nous avons ensuite purifié par des techniques chromatographiques. Nous avons étudié les lipides extraits par le mélange éther, éthanol (acides gras libres, graisses neutres, phospholipides et cires A), puis l'extrait chloroformique («cires» et lipides liés).

1° — LES ACIDES GRAS LIBRES sont constitués par des mélanges d'acides saturés normaux, acides laurique, myristique, palmitique, stéarique ; d'acides insaturés normaux : palmitoléique et oléique ; et d'un acide C_{17} à noyau cyclopropanique, l'acide cis-méthylène-9, 10 hexadécanoïque.

2° — LES GRAISSES NEUTRES isolées après séparation sur colonne de silice sont des mélanges complexes de mono-, di- et triglycérides, dont la partie acide se compose des mêmes acides gras saturés, insaturés et de l'acide en C_{17} à noyau cyclopropanique.

3° — DANS LES FRACTIONS PHOSPHOLIPIDES ET «CIRES A» (qui sont des mélanges de glycérides et de phospholipides) nous avons isolé :

a) le sel de magnésium d'un acide phosphatidique dont les acides gras sont principalement les acides myristique et palmitique.

b) une fraction contenant, après hydrolyse, tous les acides gras identifiés dans la fraction «acides gras libres», du glycérol, de l'éthanolamine et de la sérine.

4° — LA FRACTION « CIRES CHLOROFORMIQUES » se compose de :

a) une fraction complexe dans laquelle nous avons mis en évidence, après hydrolyse, des acides aminés, des hexo-

samines, du glycérol ainsi que les acides gras trouvés dans les autres fractions. Nous ne pensons pas que la présence de ces constituants résulte d'une contamination de cette fraction par des corps bactériens ou par des peptides. (Nous avions, en effet, filtré sur filtre Millipore le produit d'extraction, puis purifié par filtration sur colonne de cellulose). Cette fraction a d'autre part une teneur élevée en phosphore. Il est donc possible que ces lipides soient des mélanges de phospholipides et de peptidolipides, difficiles à séparer par la technique utilisée.

b) une fraction contenant des phospholipides;

c) une fraction contenant un produit dont le spectre infrarouge est celui d'un composé aromatique et dont la partie acide a été identifiée comme étant l'acide phtalique. Cet acide phtalique semble provenir de la dégradation de la vitamine K sous l'action prolongée de la potasse méthanolique.

5° — LES LIPIDES LIES ont été étudiés qualitativement, en raison des très faibles quantités que nous avons pu isoler (0,8% par rapport au poids sec). Comme les cires D, ils contiennent du phosphore, de l'azote et tous les constituants du mucopeptide de la paroi du microorganisme isolé et identifié par FLECK (215). Dans la fraction hydrosoluble nous décelons en plus des sucres et de l'inositol.

6° — COMPARAISON AVEC LES LIPIDES DE LA FORME BACTERIENNE NORMALE.

a) teneur en lipides.

La teneur en lipides par rapport au poids sec est augmentée dans le cas des formes L. Elle varie cependant d'une série d'expériences à l'autre, alors que pour les formes normales la concordance est bonne. Nous l'expliquons par la perte de substances hydrosolubles due à la lyse partielle des formes L, très fragiles du fait de l'absence de paroi rigide. Il est donc difficile de ramener la teneur en lipides des formes L au poids sec ou même aux protéines, la composition chimique globale variant d'une récolte à l'autre.

Nous avons par conséquent considéré les proportions des différentes catégories de lipides par rapport aux lipides totaux extraits dans les mêmes conditions.

b) proportions d'acides gras libres et de graisses neutres.

Nous constatons que ces proportions sont inversées. Il y a plus d'acides gras libres dans les lipides des formes L alors qu'il y a plus de graisses neutres dans ceux du P_{18}.

c) variations dans les proportions relatives des acides gras libres.

Les proportions des acides saturés sont très voisines dans les deux cas. Celles des acides hexadécanoïque et méthylène-hexadécanoïque sont, par contre, différentes. Chez les formes L, le pourcentage en acide palmitoléique est de 14%, celui de l'acide en C_{17} à noyau cyclopropanique de 12%. Dans le cas du P_{18} ces proportions sont respectivement de 21% pour 3%. Ces variations sont vraisemblablement dues à la différence du temps d'incubation, si l'on admet que la synthèse de l'acide en C_{17} se fait à la fin de la phase de croissance exponentielle à partir de l'acide insaturé en C_{16}. NESBITT et coll. (216) ont confirmé ultérieurement ces résultats, mais signalent encore la présence d'acides hydroxylés, que nous n'avons pas pu retrouver.

d) les phospholipides et les cires A.

La teneur en phospholipides par rapport au poids sec est de 2 à 3 fois plus élevée dans le cas des formes L alors que les proportions par rapport aux lipides totaux sont identiques dans les deux cas (70%). Leur constitution chimique est également identique.

e) les cires chloroformiques et les lipides liés.

La comparaison est particulièrement délicate, car les quantités isolées sont très faibles. Nous retrouvons cependant la même composition en acides gras, oses, acides aminés dans le cas des formes bactériennes normales.

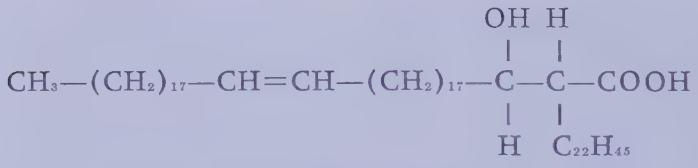
Le fait de retrouver tous les constituants caractéristiques du mucopeptide de la paroi montre que, si les formes L sont dépourvues de parois rigides, elles possèdent tous les constituants de la paroi, ce qui est en bon accord avec les résultats rapportés par ailleurs (215).

L'étude comparative des lipides des formes bactériennes normales et des formes L qui en dérivent montre que, si les conditions de culture influencent les proportions

relatives des différents constituants, elles n'expliquent pas l'augmentation de la teneur en lipides des formes L. Cette teneur élevée en lipides s'expliquerait plutôt, non pas par une augmentation de lipides, mais par la diminution de la teneur en substances hydrosolubles, qui passeraient, par suite de la grande perméabilité de la paroi des formes L, dans le milieu de culture.

Dans la deuxième partie, nous étudions la structure et la biogénèse d'un nouveau type d'acides mycoliques isolé de *Mycobactérium smegmatis.*

La structure I a été proposée pour l'un des représentants principaux.



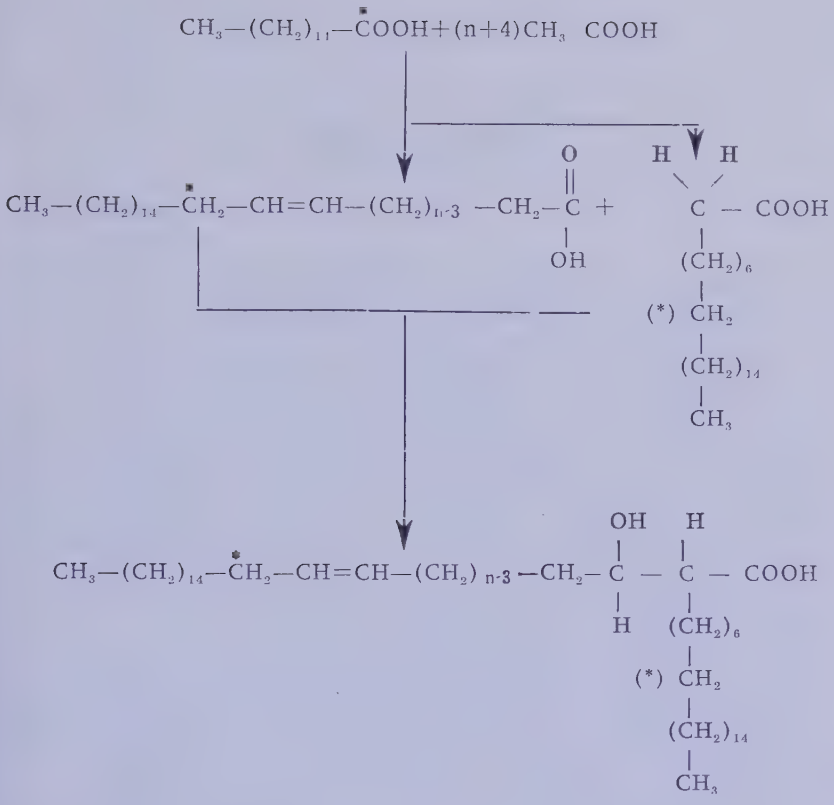
$C_{62}H_{122}O_3$

(I)

Cette structure a été déterminée par spectrométrie de masse, spectre de RMN, spectre infrarouge ainsi que par l'étude des composés dérivés ou résultant de dégradations.

Ce type d'acides mycoliques, appelé acides α'-smegmamycoliques, donne par pyrolyse l'acide tétracosanoïque ; le squelette hydrocarboné des fragments méromycoliques est, à une ou deux doubles liaisons près, du type mérono-cardique.

Nous avons d'autre part étudié la biogénèse de ce même type d'acides mycoliques isolé de la même souche cultivée sur milieu contenant du palmitate de potassium radioactif. Après avoir étudié la distribution de la radio-activité dans les molécules d'acides α'-smegmamycoliques, nous proposons la voie de biogénèse suivante :



Cette voie de biogénèse des acides mycoliques en C_{60} est en accord avec le schéma de biogénèse proposé récemment pour les acides mycoliques en général.

Dans une première étape, l'acide palmitique ou stéarique subirait un allongement de chaîne avec des unités acétiques, puis une désaturation partielle pour aboutir à un acide du type méronocardique.

Dans une deuxième étape, il y aurait condensation mycolique de la partie méronocardique et de l'acide tétracosanoïque pour donner des acides α'-smegmamycoliques.

Bibliographie

(1) HAMMERSCHLAG, A. Bacteriologisch-chemische Untersuchungen der Tuberkelbazillen **Wien. Akad. Ber.** 1888, **97,** 988, **Monatshefte d. Chemie** 1889, **10,** 9.
(2) ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1927, **74,** 547.
(3) ANDERSON R.J. **J. Biol. Chem.** 1929, **85,** 327.
(4) ANDERSON, R.J. **J. An.. Chem. Soc.** 1930, **52,** 1607
(5) ANDERSON, R.J., NEWMAN, M.S. **J. Am. Chem. Soc.** 1933, **101,** 773.
(6) CROWDER, J.A., STODOLA, F.M., PANGBORN, M.C., ANDERSON R.J. **J. Am. Chem. Soc.** 1936, **58,** 636.
(7) ANDERSON, R.J. The chemistry of the lipids of the tubercle bacillus and certain other microörganisms, **Fortsch. Chem. organ. Naturstoffe,** 1939, **3,** 145.
(8) ANDERSON, R.J. **Harvey Lectures** 1939-1940, **271.**
(9) ANDERSON, R.J. **Chem. Rev.** 1941, **29,** 225.
(10) ANDERSON, R.J. **Yale J. Biol. Med.** 1943, **15,** 311.
(11) DE SUTO-NAGY, ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1947, **171,** 749.
(12) ASSELINEAU, J., LEDERER E. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1949, **31,** 492.
(13) ASSELINEAU, J. CHOUCROUN, M., LEDERER, E. **Biochim. Biophys. Acta,** 1950, **5,** 197.
(14) LEDERER, E. **Colloqium on the Chemotherapy of Tuberculosis,** Trinity College, Dublin 1962.
(15) LEDERER, E. **Symposium sur le Métabolisme microbien au IIe Congrès International de Biochimie,** Paris 1952, 5.
(16) ASSELINEAU, J. et LEDERER, E. **Progrès chim. subst. org. Natur.** 1953, **10.** 170.
(17) ASSELINEAU, J. et LEDERER, E. **Ciba Foundation Symposium of experimental tuberculosis,** 1955. 14.
(18) LEDERER, E. **Festschrift Arthur Stoll** 1957, 384.
(19) JOLLES, P., SAMOUR, D., LEDERER,E. **Biochim. Biophys. Acta** 1963, **78,** 342.
(20) CHAPUT, M., MICHEL, C., LEDERER, E. **Biochim. Biophys, Acta** 1963, **78,** 329.
(21) ASSELINEAU, J. **Progrès de l'exploration de la tuberculose,** 1952, **5,** 1.
(22) ASSELINEAU, J. **Thèse ès-Sciences,** Paris 1950.
(23) DEMARTEAU-GINSBURG, H. **Thèse,** Paris 1958.
(24) VILKAS, E. **Thèse ès-Sciences,** Paris 1960.
(25) WEIBULL, C. **Acta Chem. Scand.** 1957, **11,** 881.
(26) MACFARLANE, M.G. **Biochem. J.** 1961, **79,** 4 P, 1961, **80,** 45 P.
(27) MARR, A.G., INGRAHAM, J.L. **J. Bacteriol,** 1962, **84,** 1260.
(28) NEIDHARDT, F.C. **An. Review of Microbiol.** 1963, **17,** 61.

(29) CREACH, O., COLOBERT, L. **Pathologie - Biologie** 1962, **Vol. 10** No 13-14/15-16, 1227.
(30) NOLL, H., BLOCH, H., ASSELINEAU, J., LEDERER, E. **Biochim. Biophys, Acta.** 1956, **20,** 299.
(31) BOIVIN, A., MESROBEANU, I. **C. R. Soc. Biol.** 1933, **114,** 307.
(32) WESTPHAL, O., LUDERITZ, O. **Angew. Chemie** 1954, **66,** 407.
(33) RIBI, E., HASKINS, W.T., LANDY, M., MILNER, K. **Bact. Rev.** 1961, **25,** 427.
(34) WHITE, R.G., COONS, A.H., CONCLLY, J.M. **J. Exp. Méd.** 1955, **102,** 83.
(35) WORK, E. **J. Gen. Microbiol.** 1961, **25,** 167.
(36) SALTON, M.R. **J. Gen. Microbiol.** 1962, **29,** 15.
(37) SALTON, M.R. **J. Microbiol. Cell Walls** John Wiley and Sons suc. New-York 1961.
(38) STROMINGER, J.L., in **The Bacteria III,** 413 - Gunsalus I.C. Stainer R.Y. - Academic Press New-York 1962.
(39) KLIENEBERGER-NOBEL, E. **J. Path. Bact.** 1935, **40,** 93.
(40) DIENES, L. **J. Inf. Dis.**1939, **65,** 24.
(41) VENDRELY, R., TULASNE, R. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1952, **34,** 785.
(42) VENDRELY, R., TULASNE, R. **Nature,** 1953, **171,** 262.
(43) MANDEL, P., TERRANOVA, T., SENSENBRENNER, M. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1957, **245,** 1469.
(44) SENSENBRENNER, M., BADER, A.M., TERRANOVA, T., MANDEL P. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1960, **250,** 3420.
(45) MANDEL, P., WEILL, J.D., LEDIG, M. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1956, **38,** 71.
(46) TERRANOVA, T., MANDEL P. **Giornale di Batt. Virol. ed Immunol.** 1960.
(47) REBEL, G., BADER, A.M., SENSENBRENNER, M., MANDEL, P. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1960, **250,** 3516.
(48) KREMBEL, J., DELUZARCHE, A., MINCK, R. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1961, **253,** 2005.
(49) MINCK, R., FRUHLING, L. **C. R. Biol.** 1954, **148,** 2091.
(50) NOLL, M., JACKIM, E. **J. Biol. Chem.** 1958, **232,** 903.
(51) VILKAS, E., LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1956, **38,** 111.
(52) ASSELINEAU, J., BUC, H., JOLLES, P., LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1958, **40,** 1953.
(53) ASSELINEAU, J. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1956, **38,** 1937.
(54) LANEELLE, G. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1963, **257,** 781.
(55) JAMES, A.T., MARTIN, A.J.P. **Biochem. J.** 1956, **63,** 144.
(56) ASSELINEAU, J. **Ann. Inst. Pasteur** 1961, **100,** 109.
(57) KANESHIRO, T., MARR, A.G. **J. Lipid. Res.** 1962, **Vol. 3,** 184.
(58) BISHOP, D.G., STILL, J.L. **J. Lipid. Res.** 1963, **Vol 4,** 81.
(59) CASON J., SUMRELL,G., ALLEN, C.F., GILLIES, G.A., ELBERG, S. **J. Biol. Chem.** 1953, **205,** 435.
(60) DAUCHY, S., ASSELINEAU, J. **C. R. Ac. Sc.** Paris, 1960, **250,** 2635.
(61) KUHN, R., ROTH, H. **Chem. Berichte,** 1933, **66,** 1274.
(62) VAN RUDLOFF, E. Canad. **J. Chem.,** 1956, **34,** 1413.
(63) SCHMIDT, K.F. **Chem. Ber.** 1924, **57,** 704.
(64) PHARES, E.F. **Arch. Biochem. Biophys,** 1951, **33,** 173.

(65) CASON, J., FESSENDEN, S.S. **Tetrahedron Letters** 1959, **7,** 289.
(66) CHANLEY, J.D., POLGAR, N. **Nature** 1950, **166,** 693.
(67) HOFMANN, K., LUCAS, R.A., SAX, M. **J. Biol. Chem.** 1952, **195,** 473.
(68) CASON, J., URSCHELER, H.R., ALLEN, C.F. **J. Org. Chem.** 1957, **22,** 1284.
(69) STÄLLBERG-STENHAGEN, S., STENHAGEN, E. **J. Biol.** 1941, **139,** 145
(70) SPIEGEL, A.M., HEMY, G.C., **J. Biol. Chem.** 1941, **140,** CXXII.
(71) ASSELINEAU,, C., ASSELINEAU, J. RYHAGE, R., STÄLLBERG-STENHAGEN, S., STENHAGEN, E. **Acta Chem. Scand.** 1959, **13,** 822.
(72) ASSELINEAU, J., RYHAGE, R., STENHAGEN,E. **Acta Chem. Scand.** 1957, **11,** 196.
(73) AHLQUIST, L., ASSELINEAU, C., ASSELINEAU, J., STÄLLBERG-STENHAGEN, S., STENHAGEN, E. **Ark. Kemi.** 1959, **13,** 543.
(74) RYHAGE, E., VON SYDOW, E., STENHAGEN, E. **Acta Chem. Scand.** 1957, **11,** 180.
(75) RYHAGE, R., STENHAGEN, E. **Arkiv, für. Kemi.** 1959, **13,** 523.
(76) RYHAGE, R., STENHAGEN, E., **J. Lipid. Res.** 1960, **1,** 523.
(77) ETEMADI, A.H., OKUDA, R. et LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1964, 868.
(78) ETEMADI, A.H. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1964, 1537.
(79) ETEMADI, A.H., MIQUEL, A.M., LEDERER, E. et BARBER, M. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1964, 3274.
(80) BORDET, Cl., ETEMADI, A.H., MICHEL, G. et LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1965, 234.
(81) BARBER, M., JOLLES, P., VILKAS, E. et LEDERER, E **Biochem. Biophys. Research Com.** 1965, **18,** 469.
(82) BARBER, M., WOLSTENHOLME, W.A., GUINAND, M., MICHEL, G., DAS, B.C., LEDERER, E. **Tetrahedron Letters** 1965, 1331.
(83) LANEELLE, G., ASSELINEAU, J., WOLSTENHOLME, W.A. et LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1965, 2133.
(84) RINEHART, K.L, WILSSON, W.A., WHALEY, H.A. **J. Am. Chem, Soc.** 1958, **80,** 503.
(85) CARTER, H.E., SMITH, D.B., JONES, D.N. **J. Biol. Chem.** 1958, **232,** 681.
(86) STÄLLBERG-STENHAGEN, S., STENHAGEN, E. **J. Biol. Chem.** 1942 **143,** 171.
(87) ANDERSON, R.J., **J. Biol. Chem.** 1929, **83,** 169.
(88) ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1932, **97,** 639.
(89) CHARGAFF, E. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.** 1931, **201,** 191.
(90) CHARGAFF, E. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.** 1933, **218,** 223.
(91) ASSELINEAU, J. ,MORON, J. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1958, **40,** 899.
(92) BERGSTRÖM, S., THEORELL, H., DAVIDE, H. **Arch. Biochem.,** 1946, **10,** 165.
(93) ABEL, K., De SCHMERTZING, H. PETERSON, J.I. **J. Bacteriol.** 1963, **85,** 1043.
(94) ASSELINEAU, J. **Les lipides bactériens, in Handbuch der Pflanzenphysiologie** - Springer Heidelberg 1957, **VII,** 90.
(95) ETEMADI, A.H. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1963, **45.** 1423.
(96) SPIELMANN, M.A. **J. Biol. Chem.** 1934, **106,** 87.
(97) GINGER, L.G., ANDERSON, R.G. **J. Biol. Chem.** 1945, **157,** 203.
(98) POLGAR, N. **Chem. Ind.** 1953, 353.

(99) POLGAR, N., ROBINSON, R. **Chem. Ind.** 1951, 685.
(100) GUBAREV, E.M., LUBENETS, E.K., KANCHUCKH, AA., GALAEV, Y.V. **Biochimiya** 1951, **16,** 139.
(101) HOFMANN, K., LUCAS, R.A. **J. Am. Chem. Soc.** 1950, **72,** 4328.
(102) CHARGAFF, E., LEVINE, M. **J. Biol. Chem.** 1938, **124,** 195.
(103) HOFMANN, K., OROCHENA, S.F. C.W. OYO. **J. Am. Chem. Soc.** 1957, **79,** 3608.
(104) CRAVEN, B., JEFFREY, G.A. **J. Am. Chem. Soc.** 1960, **82,** 3858.
(105) O'LEARY, W.M. **J. Bacteriol.** 1959, **77,** 367.
(106) O'LEARY, W.M. **J. Bacteriol.** 1959, **78,** 709.
(107) LEDERER, E., PUDLES, J., **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1951, **33,** 1003.
(108) LEDERER, E., PUDLES, J., BARBEZAT, S., TRILLAT, J.J. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1952, **19,** 93.
(109) ETEMADI, A.-H., GASCHE, J., SIFFERLEN, J. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1965, **47,** 631.
(110) PUDLES, J., LEDERER, E., **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1954, **36,** 759.
(111) GUBAREV, E.M. **Uspekhi Sovremennoi Biol.** (U.R.S.S.) 1951, **31,** 108.
(112) ASANO, M., TAKAHASHI, H. **J. Pharm. Soc. Japan** 1945, **65,** 81 ; C.A. 1951, **45,** 4303.
(113) ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1929, **85,** 351.
(114) CASON, J., ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1938, **126,** 527.
(115) ANDERSON, R.J., CREIGHTON, M.M. **J. Biol. Chem.** 1939, **129,** 57.
(116) ANDERSON, R.J., PECK, R.C., CREIGHTON, MM. **J. Biol. Chem.** 1940, **133,** 675.
(117) PECK, R.L., ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1941, **140,** 89.
(118) GEIGER, W.B., ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.**1939, **131,** 539.
(119) ASSELINEAU, J., LEDERER, E. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1949, **228,** 1892.
(120) STODOLA, F.H., LESUK, A,, ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1938, **126,** 505.
(121) ANDERSON, R.J., CROWDER, J.A., NEWMAN, M.S., STODOLA, F.M. **J. Biol. Chem.** 1936, **113,** 637.
(122) BLOCH, K. **Biochem. Z.,**1936, **285,** 372.
(123) MACHEBOEUF, M., FAURE, M. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1939, **209,** 700.
(124) CMELICK, S. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemi.** 1955, **302,** 20.
(125) SAITO, K., AKASHI, S. **J. Biochem.** (Japan) 1957, **44,** 511.
(126) AKASHI, S., SAITO, K. **J. Biochem.** (Japan) 1960, **47.** 222.
(127) VILKAS, E., LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1956, **38,** 111.
(128) CROWDER, J.A., ANDERSON, R.J. **J. Biol. Chem.** 1934, **104,** 487.
(129) FEW, A.V., **Biochim, Biophys. Acta.** 1955, **16,** 137.
(130) KUROKAWA, M., HOTTA, K., YOSHIMURA, Y., MAKITA, M., HARA, I. **Bull. Chem. Soc.** (Japan) 1959, **32,** 28.
(131) ANDERSON, R.J., RENFREW, A.G. **J. Am. Chem. Soc.** 1930, **52,** 1252.
(132) ANDERSON, R.J., ROBERTS, E.G. **J. Am. Chem. Soc.** 1930, **89,** 611.
(133) DE SUTO-NAGY, G.I., ANDERSON, J. **J. Biol. Chem.** 1947, **171,** 761.
(134) BALLOU, C.E., VILKAS, E., LEDERER, E. **J. Biol. Chem.** 1963, **238,** 69.
(135) LEE, Y.C., BALLOU C.E. **J. Biol. Chem.**1964, **239,** 1316.

(136) NOWOTNY, A. **J. Am. Chem. Soc.** 1961, **83,** 501.
(137) WESTPHAL, O., LUDERITZ, O. **Angew. Chem.** 1954, **66,** 407.
(138) FROMME, I., LUDERITZ, O., NOWOTNY, A., WESTPHAL, O. **Pharm. Acta Helv.** 1958, **33,** 391.
(139) PILGERAM, L.O., GREENBERG, D.M. **J. Biol. Chem.** 1955, **216,** 465.
(140) WESTLEY, J., WREN, J.J., MITCHELL, H.K. **J. Biol. Chem.** 1957, **229,** 131.
(141) GABY, W.L., NAUGTHEN, R.N., LOGAN. C. **Arch. Biochem, Biophys.** 1959. **82,** 34.
(142) LANEELLE, M.A., ASSELINEAU, J. **Biochim. Biophys. Acta** 1962, **59,** 731.
(143) BLOCH,H., DEFAYE, J., LEDERER, E., NOLL, H. **Biochim. Biophys. Acta.** 1957, **23,** 312.
(144) WIEGHARD, C.W., ANDERSON R. **J. Biol, Chem.** 1938, **126,** 515.
(145) MICHEL, G. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1957, **244,** 2429.
(146) JOLLES, P., CROS, H., LEDERER, E. **Biochim. Biophys. Acta** 1960, **43,** 559.
(147) LEDERER, E. **Advan. Carbohydrate Chem.** 1961, **16,** 207.
(148) ASSELINEAU, J. **Les lipides Bactériens, Hermann et Co. Paris** 1962, 184.
(149) CHOUCROUN, N. **An. Rev. Tuberc.** 1947, **56,** 203.
(150) WHITE, R.G., JOLLES P., SAMOUR, D., LEDERER, E. **Immunology** 1964, **72** (2), 158.
(151) HUNTER, G.D., GOODSALL, R.A. **Biochem. J.** 1961, **78,** 564.
(152) REBEL, G., BADER-HIRSCH, A.M., MANDEL, P. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1963, **45,** 1327.
(153) BARBIER, M., TOBIAS, C.A., JAEGER, R.J. **Helv. Chem. Acta** 1959, **42,** 2440.
(154) MORRIS, L.J. **in New Biochemical Separations,** A.T. JAMES et L.J. MORRIS, D. Van Nostrand Company L.t.d. London 1964, 300.
(155) PARTRIDGE, S.M. **Nature,** 1949, **164,** 443.
(156) HANES, C.S., ISHERWOOD, F.A. **Nature** 1949, **164,** 1107.
(157) BURROWS, S., CRYLLS, F.S.M., HARRISON, J.S. **Nature** 1952, **170,** 800.
(158) BANDURSKI, R.S., AXELROD, B. **J. Biol. Chem.** 1951, **193,** 405.
(159) ANET, E.F.L.J., REYNOLDS, T.M. **Nature,** 1954, **174,** 930.
(160) CONSDEN, R., CORDON, A.H., MARTIN, A.J.P. **Biochem. J.** 1944, **38,** 224.
(161) TROLL, W., CANNAN, R.K. **J. Biol. Chem.** 1953, **200,** 803.
(162) FAURE, M. dans **Technique de laboratoire,** Tome I, fascicule 2, 1288, MASSON et Cie Paris 1963.
(163) MACHEBOEUF, M., DELSAL, S. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1943, **25,** 116.
(164) TULASNE, R., MINCK, R., KIRN, A., KREMBEL. J. **Ann. Inst. Pasteur** 1960, **99,** 859.
(165) TULASNE, R., MINCK, R., KIRN A, **Ann. Inst. Pasteur** 1962, **102,** 292.
(166) FLECK J., MINCK, R. **Ann. Inst. Pasteur** 1964, **106,** 501-505.
(167) TULASNE, R., VENDRELY, R., MINCK, R., MULLER, L. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1950, **230,** 859.
(168) MEDILL, M.A., O-KANE, D.J. **J. Bacteriol,** 1954, **5,** 68, 630.
(169) MINCK, R., KIRN, A., GALLERON, M. **Ann. Inst. Pasteur** 1957, **92,** 138.

(170) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARRAND, A.L., RANDALL, R.J. **J. Biol. Chem.** 1951, **193,** 265.
(171) FOLIN, O., CIOCALTEU, V. **J. Biol. Chem.** 1937, **73,** 627.
(172) MONTREUIL, J., SCHEPPLER, N. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1959, **41,** 1.
(173) SCHMIDT, G., THANNHAUSER, S.J. **J. Biochem.** 1945, **161,** 83.
(174) SCHMITZ, A.R., METCALFE, L.D. **Anal. Chem.** 1961, **33,** 363.
(175) DINH-NGUYEN, N., RYHAGE, R. and STÄLLBERG-STENHAGEN, S. **Arkiv. Kemi.** 1960, **155,** 433.
(176) RYHAGE, R. et STENHAGEN, E. **Mass Spectrometry of organic ions.** F.W.Mac Lafferty, Ac. Press - New-York.
(177) MEIKLEJOHN, R.A., MEYER R.J., ARONOVIC, S.M., SCHUETTE, H.A., MELOCH, V.W., **Analy. Chem.** 1957, **29,** 329.
(178) CLAUSON-KAAS, N., LIMBORG. F. **Acta Chem. Scand.** 1947, **1,** 884.
(179) LO CHANG TA CHUANG, SWEELEY, C.C. **J. Lipid. Res.** 1962, **3,** 170.
(180) CRIEGEE, R., GUNTHER, J. **Chem. Berichte** 1963, **6,** 1564.
(181) ASINGER, F. **Chem. Ber.** 1942, **75,** 656.
(182) HOFMANN, K., JUCKER, O., MiLLER, M.W., YOUNG, A.C., TAUSIG, F. **J. Am. Chem. Soc.** 1954, **76,** 1779.
(183) POPLE, J.A., SCHNEIDER, W.G., BERNSTEIN, H.J. **High resolution nuclear magnetic resonance,** MC Graw Hill Bok Company (London 1959).
(184) TOUBIANA, R. **Thèse ès Sciences Paris** 1963.
(185) KANESHIRO, T., MARR, A.G. **J. Biol. Chem.** 1961, 263, 2615.
(186) VACZI, L., FARKAS, L. **Acta Microbiologica** 1961, **VIII,** 2, 205.
(187) LIU TY, HOFMANN, K. **Federation Proc.** 1960, **19,** 227.
(188) SCHALK, K.S., KODICEK, E., **Biochim. Biophys. Acta** 1961, **50,** 579.
(189) BELLAMY, L.J. **The Infra-red Spectra of Complex Molecules,** Methuen et Co. (London 1962)
(190) PARTRIDGE, S., KLIENEBERGER, J. **J. Path. Bacteriol.** 1941, **52,** 219.
(191) EDWARD, D.G.F. **J. Gen. Microbiol.** 1953, **8,** 256.
(192) SMITH, B.F., ROTHBLATT, G.H. **J. Bacteriol.** 1960, **80,** 841.
(193) LIEBERMANN, C., BURCHARD, H. - **Ber.** 1885, **18,** 1803. 1890 **Chem. Zentr.** (1) **61,** 25.
(194) KREMBEL, J. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1964, **46,** 503.
(195) GUINAND, M., MICHEL, G., LEDERER, E. **C. R. Ac. Sc.** Paris 1958, **246,** 848.
(196) FOLCH, J., LEES, A.M., MEATH, J.A., LEBARON, F.N. **J. Biol. Chem.** 1951, **191,** 833.
(197) RHODES, D.N., LEA, C.H. **Biochem. J.** 1953, **54,** 467.
(198) RHODES, D.N., LEA, C.H. **Biochem. J.** 1957, **65,** 526.
(199) HANAHAN, D.J., DITTMER, J.C., WARASHINA, E. **J. Biol. Chem.,** 1957, **228,** 685.
(200) REBEL, G., SENSENBRENNER, M., KLEIN, F., MANDEL,P. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1964, **46,** 987.
(201) ETEMADI, A.H. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1963, **45,** 631.
(202) REBEL, G., SENSENBRENNER, M., MANDEL, P. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1964, **46,** 1113.

(203) REBEL, G., et MANDEL, P. **Biochim. Biophys. Acta,** 1965, **98,** 380.
(204) AEBI, A., ASSELINEAU, J., LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1953, **35,** 661.
(205) SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. MOORE, S. **Anal. Chem.** 1958, **30,** 1190.
(206) ETEMADI, A.H. **Thèse** ès-Sciences, Paris 1965.
(207) ASSELINEAU, J. **Bull. Soc. Chim. Fr.** 1954, 108.
(208) SAUTON, B. **C. R. Ac. Sc. Paris** 1912, **155,** 860.
(209) COLOWICK, S.P. et KAPLAN, N.O. **Methods in Enzymology, Vol 4** Academic Press New-York 1957, 458.
(210) ROTH, H. dans J. Houlen-Weyl **Methoden der organischen Chemie,** N° 2, Thieme, Stuttgart 1953, 273.
(211) KANEMASA, Y., GOLDMAN, D.S. **Biochim. Biophys. Acta** 1965, **98,** 478.
(212) ETEMADI, A.H. et LEDERER, E. **Biochim. Biophys. Acta** 1965, **98,** 160.
(213) ETEMADI, A.H. et LEDERER, E. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 1965, **47,** 107.
(214) ETEMADI, A.H. et GASCHE, J. **Bull. Soc. Chim. Biol.,** sous presse.
(215) FLECK, J. **Ann. Inst. Pasteur,** 1965, **108,** 395.
(216) NESBITT J.A., LENNARZ, W.J. **J. Bacteriol.** 1965, **89,** 1020.

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE
OU, EVENTUELLEMENT, SECONDE THESE :

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES PROTEINES

Strasbourg, le 27 Janvier 1966

Le Président du Jury,

G. OURISSON

VU

Strasbourg, le 28 janvier 1966

P. LE DOYEN,

L'Assesseur,

J. FRENKEL

VU et permis d'imprimer

Strasbourg, le 1er février 1966

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université,

M. BAYEN

Table des matières

INTRODUCTION 11

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 13

TECHNIQUES GENERALES UTILISEES 18

A) Chromatographie 18
B) Dosages 20
C) Techniques physiques 21

Première partie :

ETUDE DES LIPIDES DE LA FORME L STABLE DE PROTEUS P 18 COMPARAISON AVEC LA BACTERIE D'ORIGINE

Chapitre I : EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES LIPIDES

A) Résultats

I. Obtention des bactéries 24
II. Comparaison de la forme L et de la forme bactérienne normale 25
III. Extraction et fractionnement des lipides 26

B) Partie expérimentale

I. Obtention des microorganismes 28
II. Composition chimique des microorganismes 29
III. Extraction et fractionnement des lipides 31

Chapitre II : LES ACIDES GRAS LIBRES 34

A) Résultats 36

I. Acides gras libres saturés 37
II. Acides gras libres insaturés 40
III. Acide à noyau cyclopropanique 41
IV. Comparaison avec les acides gras de Proteus P 18 44

B) Partie expérimentale

I. Extraction 47
II. Estérification 47
III. Chromatographie en phase gazeuse 48
IV. Hydrogénation 50
V. Oxydation 52
VI. Inclusion dans l'urée 53
VII. Acétylation 53

Chapitre III : LES GRAISSES NEUTRES

A) Résultats

I. Isolement et fractionnement 54
II. Saponification de la fraction I 55
III. Etude des fractions II et III 57
IV. Recherche du cholestérol 57
V. Comparaison avec les graisses neutres de P 18 58

B) Partie expérimentale

I. Isolement et fractionnement 59
II. Recherche du cholestérol 60
III. Saponification 62
IV. Hydrolyse acide 63
V. Dosage colorimétrique du glycérol 63

Chapitre IV : LES PHOSPHOLIPIDES ET LES CIRES A

A) Résultats

I. Isolement 64
II. Fractionnement 66
III. Etude du sel de magnésium d'un acide phosphatidique 69
IV. Etude de phospholipides contenant de l'éthanolamine et de la sérine 70
V. Comparaison avec les phospholipides de P 18 71

B) Partie expérimentale

I. Extraction et purification 73
II. Identification des acides gras 74
III. Analyse de la fraction hydrosoluble 74
IV. Fractionnement des phospholipides et des cires A 75
V. Identification du sel de magnésium de l'acide phosphatidique 79
VI. Identification de phosphatides contenant de l'éthanolamine et de la sérine 81

Chapitre V : LES «CIRES» CHLOROFORMIQUES ET LES LIPIDES LIES

A) Résultats

I. Etude des «cires» chloroformiques brutes 83
II. Etude des «cires» B, C et D 85
III. Etude des lipides liés 89
IV. Comparaison avec les mêmes fractions des lipides de P 18 .. 89

B) Partie expérimentale

I. Propriétés des «cires» brutes 91
II. Hydrolyse 91
III. Recherche d'acides gras à longues chaînes 92
IV. Les «cires» B, C et D : fractionnement et étude des fractions 93
V. Les lipides liés 99

Deuxième partie :

SUR LA STRUCTURE ET LA BIOGENESE D'UN NOUVEAU TYPE D'ACIDES MYCOLIQUES DE MYCOBACTERIUM SMEGMATIS

Chapitre I : STRUCTURE

A) Résultats

I. Isolement et purification 102
II. Propriétés des α'smegmamycolates 103
III. Préparation des dérivés 104
1) acétyl-α'-mycolates de méthyle 104
2) α'smegmaméromycolals 104
3) α'smegmaméromycolates de méthyle 105
4) dihydro α'smegmaméromycolates de méthyle 105
IV. Localisation de la double liaison 106
1) ozonolyse des méromycolates 106
2) ozonolyse des acétyl-α'smegmamycolals 107
V. Conclusion 109

B) Partie expérimentale

I. Isolement et purification 110
II. Préparation des dérivés 110
1) Acétyl-α'mycolates de méthyle 110
2) Méromycolals 113
3) Méromycolates de méthyle 113
4) Dihydroméromycolates de méthyle 113
III. Localisation des doubles liaisons 114

Chapitre II : BIOGENESE 115

A) Résultats

I. Isolement et purification 117
II. Dégradation 117
1) dégradation du tétracosanoate de méthyle 118
2) dégradation des méromycolals 119
III. Conclusion et discussion 122

B) Partie expérimentale

I. Culture des bactéries 124
II. Isolement des α'smegmamycolates de méthyle 124
III. Pyrolyse des α'smegmamycolates de méthyle 124
IV. Décarboxylation du tétracosanoate de méthyle 125
V. Dégradation selon KUHN et ROTH du tétracosanoate de méthyle 125
VI. Ozonolyse oxydative des méromycolals 125
VII. Décarboxylation de l'heptadécanoate de méthyle 126
VIII. Oxydation permanganique de l'hexadécylamine 126
IX. Décarboxylation de l'acide palmitique 126

CONCLUSIONS 127

BIBLIOGRAPHIE 132

TABLE DES MATIERES 140

IMPRE - STRASBOUR
5, PLACE DU CORBEA